



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Efecto in vitro del miofibroblasto cardíaco en la  
expresión de la molécula del complejo mayor de  
histocompatibilidad clase II murina (Ia) en macrófagos  
peritoneales**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología  
Molecular

**AUTOR**

Caterina PEÑA ALBORNOZ

**ASESORES**

Dr. Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Dr. Jesús Alberto MOSQUERA SULBARÁN

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Peña, C. (2019). *Efecto in vitro del miofibroblasto cardíaco en la expresión de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II murina (Ia) en macrófagos peritoneales*. Tesis para optar grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del asesor: 0000-0002-8038-2162  
Dr. Armando Yarlequé Chocas

DNI del autor: 01262552

Grupo de investigación: Caterina Peña, Renata Vargas, Juan Pablo  
Hernández-Fonseca, Jesús Mosquera

Institución que financia totalmente la investigación: Instituto de Investigaciones  
Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de  
Medicina de la Universidad del Zulia (Venezuela)

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación: Laboratorio de  
Inmunología y Biología Celular de la Facultad de  
Medicina de la Universidad del Zulia, ubicado en la  
Av. 16 con calle 67B, en la ciudad de Maracaibo,  
Estado Zulia – Venezuela.

Rango de años que la investigación abarcó: 3 años



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 172-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las...10:10... horas del día 23.04.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Libertad Alzamora Gonzéles	e integrado por
Mg. Carmen Amelia Pantigoso Flores	(Miembro)
Mg. Edith Fanincia Rodríguez Quispe	(Miembro)
Dr. Armando Yarleque Chocas	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara Doña **CATERINA PEÑA ALBORNOZ**.

Después de darse lectura al Expediente N° 172-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

**“EFECTO *IN VITRO* DEL MIOFIBROBLASTO CARDÍACO EN LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II MURINA (Ia) EN MACRÓFAGOS PERITONEALES”**, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

Universidad del Perú. Decana de América

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

**UNIDAD DE POSGRADO**

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: ..... Muy Bueno con la nota de 18 .....

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular a la señorita Doña **CATERINA PEÑA ALBORNOZ**.

Siendo las 11:40 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 23 días del mes de julio del año 2019.

**Dra. Libertad Alzamora Gonzáles**  
Profesora Principal a D.E.  
PRESIDENTE  
REGINA N° 14242

**Dr. Armando Yarleque Chocas**  
Profesor Principal a T.C.  
ASESOR  
REGINA N° 18589

**Mg. Carmen Amelia Pantigoso Flores**  
Profesora Principal a T. C.  
MIEMBRO  
DINA N° 3782

**Mg. Edith Fanincia Rodríguez Quispe**  
Profesora Principal a T. C.  
MIEMBRO  
REGINA N° 17149

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia (Venezuela), bajo el asesoramiento del Dr. Jesús Alberto Mosquera Sulbarán como Jefe del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular. Teniendo como asesor de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, al Dr. Armando Yarlequé Chocas como Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi apreciado asesor y amigo Dr. Jesús Mosquera, por su orientación y apoyo incansable durante la realización de este trabajo. Su guía y sapiencia han sido un pilar a lo largo de mi carrera profesional.

Al Dr. Armando Yarlequé, por asumir la asesoría de este trabajo y brindarme su apoyo incondicional durante mis estudios de maestría, por compartir sus valiosos conocimientos, su tiempo y experiencia profesional.

A mis estimados compañeros, amigos y a todos los que forman parte de la gran familia del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Universidad del Zulia, quienes siempre estuvieron dispuestos a facilitarme la ayuda requerida para llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, especialmente a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, por abrirme las puertas y darme la oportunidad de participar en su programa de formación académica.

A todos mis profesores de la Maestría en Biología Molecular por su dedicación y conocimientos impartidos. A mi jurado de tesis integrado por la Dra. Libertad Alzamora, Mg. Carmen Pantigoso y Mg. Edith Rodríguez, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al personal administrativo de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a Dorita por todo su apoyo y paciencia durante mis estudios y trámites para obtener el grado.

A Alex, quien me impulsó a estudiar la maestría en su alma mater, por su apoyo incondicional, confianza en mis capacidades, por sus consejos, afecto y palabras de aliento en los momentos clave.

A mi familia y a todos mis seres queridos quienes, con su amor y respaldo, me inspiraron y fueron fuente de fortaleza y estímulo para mí.

A quienes no menciono en este aparte, pero que de una u otra forma me brindaron su ayuda tanto a nivel personal como académico.

A todos les estoy verdaderamente agradecida. Dios les bendice grandemente.



## **DEDICATORIA**

*A Dios y a mis seres amados con amor y gratitud*

# CONTENIDO

	Pág.
Lista de Figuras.....	i
Lista de Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	5
III. Hipótesis.....	10
IV. Objetivos.....	10
4.1. Objetivo general.....	10
4.2. Objetivos específicos.....	10
V. Materiales y Métodos.....	11
5.1. Animales de experimentación.....	11
5.2. Aislamiento del tejido cardíaco de ratas neonatales de la cepa Lewis.....	11
5.3. Cultivo de miofibroblastos cardíacos.....	13
5.4. Inducción y aislamiento de la molécula <i>Ia</i> en macrófagos peritoneales.....	14
5.5. Marcaje radiactivo del anticuerpo monoclonal anti- <i>Ia</i> de rata.....	15
5.6. Determinación de proteínas.....	16
5.7. Experimentos para determinar el efecto del contacto con los miofibroblastos en la expresión de <i>Ia</i> en macrófagos peritoneales.....	16
5.7.1. <i>Estudios de inmunofluorescencia</i> .....	17
5.7.2. <i>Análisis mediante radioinmunoensayo</i> .....	18
5.8. Experimentos para determinar el efecto del (los) factor(es) soluble(s) producido(s) por los miofibroblastos sobre la expresión de <i>Ia</i> en macrófagos peritoneales inducidos por interferón gamma.....	19
5.8.1. <i>Cultivos de macrófagos con interferón gamma (IFN-<math>\gamma</math>)</i> .....	19
5.8.2. <i>Cultivos de macrófagos con interferón gamma y medio condicionado por miofibroblastos</i> .....	20
5.9. Análisis estadístico.....	21
VI. Resultados.....	22

6.1. Efecto del contacto del miofibroblasto sobre la expresión de la molécula <i>Ia</i> en los macrófagos peritoneales <i>Ia</i> positivos durante 3 y 7 días de co-cultivo.....	22
6.2. Efecto del medio condicionado por cultivos de miofibroblastos sobre la expresión de la molécula <i>Ia</i> inducida por el interferón gamma en macrófagos peritoneales <i>Ia</i> negativos.....	28
6.3. Resumen de los efectos del miofibroblasto cardíaco sobre la expresión de la molécula <i>Ia</i> en macrófagos peritoneales.....	28
VII. Discusión.....	31
7.1. Efecto del contacto del miofibroblasto sobre la expresión de la molécula <i>Ia</i> en los macrófagos peritoneales <i>Ia</i> positivos durante 3 y 7 días de co-cultivo.....	31
7.2. Efecto del medio condicionado por cultivos de miofibroblastos sobre la expresión de la molécula <i>Ia</i> inducida por el interferón gamma en macrófagos peritoneales <i>Ia</i> negativos.....	33
VIII. Conclusiones.....	36
IX. Recomendaciones.....	37
X. Referencias Bibliográficas.....	38
XI. Anexos.....	45
Anexo 1. Soluciones.....	46
Anexo 2. Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar la molécula <i>Ia</i> expresada en macrófagos peritoneales murinos.....	48

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Hallazgos de inmunofluorescencia a los 3 días del cultivo de macrófagos peritoneales tratados con <i>Listeria monocytogenes</i> y los co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos cardíacos.....	23
<b>Figura 2.</b> Hallazgos de inmunofluorescencia a partir de los 3 días del co-cultivo de macrófagos peritoneales tratados con <i>Listeria monocytogenes</i> : miofibroblastos cardíacos.....	24
<b>Figura 3.</b> Hallazgos de inmunofluorescencia a partir de 7 días del co-cultivo de macrófagos peritoneales tratados con <i>Listeria monocytogenes</i> : miofibroblastos cardíacos.....	25
<b>Figura 4.</b> Efecto del contacto celular en la expresión de <i>Ia</i> en macrófagos.....	27
<b>Figura 5.</b> Efecto del medio condicionado por fibroblastos (MCF) en la expresión de <i>Ia</i> inducida por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en macrófagos obtenidos con proteosa peptona.....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema del efecto del miofibroblasto cardíaco en la expresión de la molécula <i>Ia</i> .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina del músculo liso
BCA	Ácido bicinconínico
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígenos
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DE	Desviación estándar
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR
HBS	Solución salina balanceada de Hank
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N [-2-etanosulfónico (buffer)
$^{125}\text{I}$	Isótopo radiactivo yodo-125
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
ITIM	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas
IVIC	Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
KCl	Cloruro de potasio
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MCF	Medio condicionado por miofibroblastos
MEC	Matriz extracelular
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de magnesio hexahidratado
MINSA	Ministerio de Salud del Perú
MPM	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
NaCl	Cloruro de sodio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de sodio
NF- $\kappa\text{B}$	Factor nuclear <i>kappa</i> B
NIH	Instituto Nacional de Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$

## RESUMEN

La regulación positiva de los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) es importante durante los eventos inflamatorios del corazón. Los miofibroblastos pueden modular la expresión de esta molécula en los tejidos. Para evaluar esta posibilidad, se estudió el efecto del contacto del miofibroblasto cardíaco con los macrófagos peritoneales y el efecto de la producción del (los) factor(es) inhibidor(es) de los miofibroblastos en la expresión del CMH (*Ia*) por los macrófagos. Los macrófagos peritoneales *Ia* positivos inducidos por *Listeria monocytogenes* (alta expresión de *Ia*) se cultivaron conjuntamente con miofibroblastos cardíacos durante 3 y 7 días (contacto célula a célula). Los macrófagos estimulados con proteosa peptona (baja expresión de *Ia*) se cultivaron durante 3 días con interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y medio condicionado por cultivos de miofibroblastos (MCF). La expresión de *Ia* fue analizada por inmunofluorescencia y por radioinmunoensayo. El contacto con los miofibroblastos indujo disminución de la expresión de la molécula *Ia* en los macrófagos ( $p < 0,001$ ). Esto fue confirmado por el análisis con radioinmunoensayo en co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos ( $p < 0,001$ ). La tinción doble para *Ia* y CD14 mostró que solo las células positivas para CD14 (macrófagos) expresaban la molécula *Ia*. El MCF fue capaz de disminuir la expresión de *Ia* inducida por IFN- $\gamma$  en los macrófagos ( $p < 0,001$ ). La expresión disminuida de *Ia* en los macrófagos inducida por los miofibroblastos podría ser importante en la resolución de los procesos inflamatorios del corazón, que probablemente involucre la redistribución de la molécula *Ia* en la membrana celular por contacto célula a célula y la producción del (los) factor(es) inhibidor(es) por parte de los miofibroblastos.

**Palabras clave:** Corazón, inflamación, miofibroblastos, macrófagos, molécula *Ia*.

## ABSTRACT

Positive regulation of the Major Histocompatibility Complex (MHC) antigens is important during inflammatory events of the heart, and myofibroblasts can modulate the expression of this molecule in tissues. To evaluate this possibility, the effect of cardiac myofibroblast contact with macrophages and the effect of the production of inhibitory factor(s) of myofibroblasts on the expression of MHC (*Ia*) of macrophages was studied. *Ia* positive peritoneal macrophages induced by *Listeria monocytogenes* (high expression of *Ia*) were cultured together with cardiac myofibroblasts for 3 and 7 days (cell-to-cell contact). Macrophages stimulated with proteose peptone (low expression of *Ia*) were cultured for 3 days with interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and medium conditioned by myofibroblasts (MCF). The expression of *Ia* was analyzed by immunofluorescence and radioimmunoassay. The contact with myofibroblasts induced decreased expression of the *Ia* molecule in macrophages ( $p < 0.001$ ). This was confirmed by radioimmunoassay analysis in macrophage: myofibroblasts co-cultures ( $p < 0.001$ ). Double staining for *Ia* and CD14 showed that only positive cells for CD14 (macrophages) expressed the molecule. MCF was able to decrease the expression of *Ia* induced by IFN- $\gamma$  in macrophages ( $p < 0.001$ ). The decreased expression of *Ia* in macrophages induced by myofibroblasts could be important in the resolution of inflammatory processes of the heart, which probably involves redistribution of *Ia* molecule in the cell membrane by cell-to-cell contact and the production of inhibitor factor(s) of myofibroblasts.

**Key words:** Heart, inflammation, myofibroblasts, macrophages, *Ia* molecule.

## I. INTRODUCCIÓN

La inflamación cardíaca, definida como células inflamatorias que experimentan migración transendotelial en el tejido cardíaco, ha sido documentada en muchos estudios experimentales y clínicos de insuficiencia cardíaca (Duerrschmid *et al.*, 2013). Algunas formas de insuficiencia cardíaca están claramente asociadas con la inflamación cardíaca, como la miocarditis viral (Kindermann *et al.*, 2008) y también la isquemia cardíaca aguda (Dobaczewski *et al.*, 2010).

Durante el daño cardíaco, las señales de alarma endógenas denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) se activan, los cuales pueden ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) expresados en la superficie o en el citoplasma de los neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y otras células inmunitarias (Saparov *et al.*, 2017).

La interacción DAMP - PRR estimula la cascada del complemento y la señalización por medio de los receptores tipo toll, lo que resulta en la activación del sistema del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e inducción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión. Las interacciones entre las quimiocinas y las moléculas de adhesión celular en las células endoteliales y sus receptores en los leucocitos llevan al reclutamiento y extravasación de neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos en el miocardio lesionado (Frangogiannis, 2014). Los infiltrados de leucocitos incluyen mayormente células T activadas (CD45RO+, CD3+) con un número moderado de linfocitos citotóxicos (CD8+) y monocitos/macrófagos (CD68+) (Frustaci y Chimenti, 2015).

En particular, la miocarditis constituye un cuadro inflamatorio causado por diversas infecciones con microorganismos, autoinmunidad, enfermedades sistémicas, fármacos, toxinas e inclusive el corazón infartado, capaces de inducir arritmias, shock cardiogénico y muerte (Park *et al.*, 2014). Aproximadamente el 40% de los casos de miocarditis aguda se resuelven espontáneamente (Dec *et al.*, 1985),



mientras que el porcentaje restante evoluciona a la fase crónica debido a una respuesta inmunitaria anormal (Miyagawa *et al.*, 2014; Kawai y Shimada, 2014), lo que sugiere una modulación inmunológica durante la miocarditis. Sin embargo, los mecanismos que regulan la respuesta inmunitaria normal o anormal del huésped que conduce a la resolución espontánea del proceso inflamatorio, o bien, al daño mediado por el sistema inmunitario siguen siendo desconocidos. La regulación positiva del antígeno de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH II; denominado *Ia* en ratas) en el tejido miocárdico de pacientes con miocarditis puede representar un marcador de los eventos inflamatorios (Wojnicz *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2014).

Es bien sabido que, en todo proceso inflamatorio, la expresión de las moléculas del CMH en las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales garantiza la presentación antigénica y su correspondiente reconocimiento por la maquinaria de defensa del huésped. Durante todos estos eventos, se producen interacciones célula a célula y célula con la matriz extracelular. En esta última hay un predominio importante de las células conocidas como fibroblastos (Abbas *et al.*, 2008; Lam y Huttenlocher, 2013; Lämmermann y Germain, 2014).

Cabe recordar que el miocardio se compone de tres tipos de células principales: cardiomiocitos contráctiles, células vasculares y fibroblastos. Los fibroblastos constituyen aproximadamente entre un 60 a un 70% (Van Linthout *et al.*, 2014) de la población total de células cardíacas, proporcionando un apoyo estructural básico a través de la secreción de matriz extracelular (MEC) en el espacio intersticial (Banerjee *et al.*, 2007; Souders *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2016).

Además, los fibroblastos cardíacos desempeñan muchas funciones poco consideradas, tales como la señalización paracrina, el acoplamiento eléctrico y la reparación de tejidos (Evans, 2015). Esta última función amerita la transformación de los fibroblastos quiescentes en un estado de alta contractilidad y producción de MEC, denominado *miofibroblasto* (Turner, 2011). Los miofibroblastos pueden tener

funciones beneficiosas de curación de heridas, pero también pueden producir fibrosis patológica y la formación de cicatrices cuando no están lo suficientemente regulados. La fibrosis es una afección en donde el depósito y remodelado en exceso del material de la MEC provoca un aumento de la rigidez tisular que, en última instancia, puede distorsionar gravemente la estructura y función de los órganos afectados (Hinz, 2009; Elson *et al.*, 2018). Por lo tanto, el control estricto de la plasticidad del fibroblasto es esencial para el mantenimiento de la función cardíaca normal.

Estudios recientes revelan que, durante la fase inflamatoria cardíaca, los miofibroblastos cardíacos residentes pueden servir como una fuente importante de citocinas/quimiocinas (Shinde y Frangogiannis, 2014; Turner, 2011; Turner *et al.*, 2009). Los gradientes de quimioquinas son necesarios para reclutar leucocitos en el tejido diana y los fibroblastos activados parecen ser una fuente importante de estas sustancias quimioatrayentes. Además, el medio condicionado por fibroblastos activados mecánicamente incrementa la migración de las células inflamatorias hacia el medio. Más aún, las células inflamatorias secretan quimioquinas cuando se estimulan con medio condicionado por miofibroblastos cardíacos (Gidday *et al.*, 2005). De hecho, el medio condicionado por miofibroblastos regula la expresión génica de la metaloproteinasa de matriz extracelular - 9 (MPM-9) en los monocitos infiltrantes (Lindner *et al.*, 2014). Este es un sello distintivo de los monocitos activados, ya que se necesita MPM-9 para romper la membrana basal y permitir una mejor migración transendotelial hacia los tejidos inflamados (Bradley *et al.*, 2012).

Adicionalmente, la activación de las interacciones adhesivas entre los leucocitos y las células endoteliales produce una infiltración intensa de leucocitos en los focos de inflamación (Entman *et al.*, 1991; Weinberger y Schulz, 2015). Estos eventos pueden inducir la interacción estrecha entre los miofibroblastos cardíacos y los monocitos/macrófagos infiltrantes que conduce a la modulación de los eventos inflamatorios (Peña *et al.*, 2018; El Kasmi *et al.*, 2014; Van *et al.*, 2014). Se ha sugerido que los fibroblastos cardíacos pueden modular a las moléculas CMH clase

II de los macrófagos por mecanismos que se desconocen hasta el momento (Frantz y Nahrendorf, 2014).

Los macrófagos peritoneales obtenidos después de la estimulación peritoneal, representan células inflamatorias e infiltrantes en la cavidad peritoneal. Previamente, este tipo celular ha sido utilizado como células inflamatorias en procedimientos experimentales (Snyder *et al.*, 1982; Reis e Sousa y Unanue, 2014; Kurt-Jones *et al.*, 1985). Por lo tanto, el objetivo de este estudio consistió en determinar el efecto del miofibroblasto cardíaco de rata sobre la expresión de la molécula *Ia* por los monocitos/macrófagos peritoneales de rata. En este sentido, los experimentos se llevaron a cabo para determinar: 1) el efecto en la modulación de la molécula *Ia* ya expresada en los monocitos/macrófagos peritoneales al estar en contacto con los miofibroblastos; 2) el efecto del(los) factor(es) del miofibroblasto soluble(s) en la expresión de la molécula *Ia* inducida por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en los monocitos/macrófagos peritoneales.

Cabe destacar que, el presente trabajo representa un estudio pionero al desarrollar una metodología que reproduce *in vitro* un posible cuadro inflamatorio en el tejido miocárdico característico de la miocarditis aguda, en donde los miofibroblastos cardíacos residentes en el tejido establecen interacciones célula a célula con los monocitos/macrófagos transitorios que expresan la molécula *Ia* del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. De allí que, los hallazgos obtenidos constituyan un aporte relevante en la resolución espontánea de los procesos inflamatorios a nivel del corazón.

## II. ANTECEDENTES

La inflamación a nivel del corazón y su dificultad de diagnóstico fueron descritas en el año 1749 por Jean Baptiste Senac, un médico radicado en Versalles (Francia), en su trabajo titulado *Traité des Maladies du Coeur* (Tratado sobre las enfermedades del corazón). El término miocarditis fue acuñado finalmente por el médico alemán Joseph Freidrich Sobernheim en 1837; sin embargo, el uso de este término incluía otras cardiomiopatías que previamente no habían sido documentadas, como la cardiopatía isquémica y la cardiopatía hipertensiva. No fue sino hasta la década de 1980 cuando la Organización Mundial de la Salud junto con la Sociedad Internacional y la Federación de Cardiología intentaron diferenciar la miocarditis de otras cardiomiopatías (Caforio *et al.*, 2013).

En general, la miocarditis se define como una enfermedad inflamatoria del tejido cardíaco (miocardio), diagnosticada por criterios histológicos, inmunológicos e inmunohistoquímicos establecidos. La miocarditis puede ser aguda, subaguda o crónica y puede involucrar áreas focales o difusas del miocardio. Como se indica en el documento de consenso del Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología sobre Enfermedades Miocárdicas y Pericárdicas (Caforio *et al.*, 2013), la miocarditis está histológicamente definida por la presencia de infiltrados inflamatorios en el miocardio, asociado con la degeneración de cardiomiocitos y necrosis por causas no isquémicas, siguiendo los criterios de Dallas (Aretz, 1987). Con respecto a los criterios inmunohistoquímicos, el documento mencionado propone que el diagnóstico debe realizarse atendiendo a la presencia de al menos 14 leucocitos/mm<sup>2</sup> del miocardio, incluyendo hasta 4 monocitos/mm<sup>2</sup> y la detección de 7 o más linfocitos T CD3 positivos (Caforio *et al.*, 2013). Esta definición involucra datos inmunohistoquímicos que ameritan la recolección de biopsias endomiocárdicas y, por lo tanto, se limita a una cohorte relativamente pequeña de pacientes o muestras de autopsia post-mortem.

En la era moderna, las estrategias terapéuticas relacionadas con la enfermedad cardiovascular han experimentado mejoras sustanciales, sin embargo, esta patología sigue siendo la mayor causa de muerte a nivel mundial. Particularmente en el Perú, las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las tres primeras causas de mortalidad, según reportes del Ministerio de Salud del Perú (MINSA) (ASIS, 2001). Un estudio reciente realizado por la firma de auditoría internacional Deloitte demostró que la insuficiencia cardíaca, el infarto al miocardio, la fibrilación auricular e hipertensión arterial son las enfermedades cardíacas de mayor incidencia en el Perú. Además, representan una carga económica considerable, con costos estimados directos e indirectos de aproximadamente 2,900 millones de soles al año. Esta cifra revela la necesidad urgente de desarrollar estrategias de tratamiento innovadoras.

En condiciones patológicas, como el infarto al miocardio o la hipertensión arterial, la función cardíaca se enfoca primordialmente en el remodelado del tejido. El remodelado se define como cambios en la organización de los componentes celulares y acelulares del corazón, y es un proceso importante que permite que este órgano se adapte a alteraciones químicas, eléctricas y mecánicas (Burchfield *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013). En la mayoría de las investigaciones dirigidas al desarrollo de estrategias terapéuticas para la atenuación del remodelado cardíaco patológico, el cardiomiocito ha sido el tipo celular más estudiado debido a su importante papel funcional en el corazón. Sin embargo, los cardiomiocitos constituyen solo el 30–40% de la población total de células cardíacas (Porter y Turner, 2009), siendo los fibroblastos cardíacos las principales células responsables de controlar muchos aspectos del desarrollo, estructura y fisiología cardíaca normal (Dostal *et al.*, 2015).

Históricamente, la función más conocida del fibroblasto cardíaco está relacionada con el mantenimiento de la integridad estructural del corazón a través de la regulación y el recambio de la matriz extracelular (MEC). Esto resulta fundamental, pues la producción y secreción controlada de las proteínas de matriz, tales como: el colágeno, la fibronectina, las metaloproteinasas de la matriz (MPM) y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (ITMP), forman una red tridimensional altamente

organizada que rodea a los cardiomiocitos capacitándolos así para tolerar el estrés mecánico y mantener la morfología miocárdica normal (Baum y Duffy, 2011).

Por otra parte, en respuesta a la lesión cardíaca o al estrés, los fibroblastos cardíacos experimentan un proceso de transición a un fenotipo celular activado conocido con el nombre de *miofibroblasto*. La primera mención de miofibroblastos cardíacos fue en la década de 1970. Estas células podían distinguirse de las células en reposo por su morfología, el aumento del citoplasma, los haces de microfilamentos y el retículo endoplásmico bien definido, y el complejo de Golgi. Más tarde, se documentó que los miofibroblastos de la piel son capaces de contraer el colágeno *in vitro* y, por lo tanto, proporcionan un papel único y esencial en la reparación de heridas al proporcionar tensión (Ivey y Tallquist, 2016).

Con el advenimiento del anticuerpo anti- $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que permite la identificación de dichos haces de microfilamento, se encontraron miofibroblastos en otros órganos lesionados, convirtiéndose así en la herramienta analítica estándar de oro para la identificación de los miofibroblastos (Ivey y Tallquist, 2016; Gabbiani *et al.*, 1972). Estudios posteriores sugirieron que la estimulación del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) inducía a la  $\alpha$ -SMA y debido a que el TGF- $\beta$  también induce la producción de colágeno, se sugirió que la  $\alpha$ -SMA podría usarse para identificar a las células productoras de colágeno después de una lesión cardíaca (Desmoulière *et al.*, 1993; Darby *et al.*, 1990; Frangogiannis *et al.*, 2000).

En la actualidad, los reportes demuestran que el miofibroblasto está caracterizado por la expresión de proteínas contráctiles, de marcadores de células de músculo liso (es decir,  $\alpha$ -actina del músculo liso) (Tilley *et al.*, 2006), por tener propiedades migratorias y proliferativas mejoradas (Porter y Turner, 2009; Gajewski *et al.*, 2006); además del depósito incrementado de colágeno y otras proteínas de la matriz que promueven la formación de cicatrices que favorecen la función reparadora del miocardio. Sin embargo, la lesión cardíaca sostenida causa la activación y proliferación crónica de los miofibroblastos, que conlleva al desequilibrio de la

secreción de colágeno/ MPM y a una fibrosis intersticial desequilibrada, rigidez ventricular, isquemia de los cardiomiocitos, entre otros efectos deletéreos (Porter y Turner, 2009; Gajewski *et al.*, 2006; Moseley *et al.*, 2003).

Es por ello que los fibroblastos/miofibroblastos cardíacos han ganado un interés creciente como objetivo terapéutico. De hecho, actualmente, muchos productos farmacéuticos empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, tienen acción directa sobre los fibroblastos/miofibroblastos cardíacos, lo que podría explicar parcialmente algunos de los efectos beneficiosos de estos fármacos (Porter y Turner, 2009; Brown *et al.*, 2005). Además, la modulación directa de la función del fibroblasto/miofibroblasto cardíaco ha demostrado ser beneficiosa en los modelos preclínicos de remodelado cardíaco (Sabri *et al.*, 2002; Gajewski *et al.*, 2006; Erlich *et al.*, 1996).

La función cardíaca, ya sea durante el desarrollo, el crecimiento normal o en respuesta a estímulos patológicos implica una combinación de señales químicas, eléctricas y mecánicas. En el caso particular del fibroblasto/miofibroblasto cardíaco, estudios recientes han documentado ampliamente que sus funciones se extienden mucho más allá del simple soporte estructural del miocardio (Dostal *et al.*, 2015; Porter y Turner, 2009; Souders *et al.*, 2009; Krenning *et al.*, 2010; Siquier *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2004). En este sentido, se ha demostrado que estas células tienen la capacidad de inducir la inflamación cardíaca después de activarse (Lindner *et al.*, 2014). Esto podría redefinir el papel de los fibroblastos cardíacos en el corazón y parece ser importante, ya que se podrían desarrollar opciones de tratamiento específicas para inhibir la activación de los fibroblastos como células de soporte inflamatorias en pacientes con insuficiencia cardíaca.

Una función que ha llamado la atención en la última década y que constituye el enfoque principal de este estudio, basado en los hallazgos reportados por nuestro grupo de investigación (Peña *et al.*, 2018), es su participación dinámica en la

interacción cruzada con células de tránsito en el miocardio (como, por ejemplo, las células inmunitarias).

Desde el punto de vista fisiopatológico, los fibroblastos activados son particularmente sensibles al estrés mecánico y a los estímulos químicos inducidos por la lesión cardíaca, lo que aumenta la producción y secreción de diversas citocinas proinflamatorias y profibróticas, factores de crecimiento y quimiocinas (Porter y Turner, 2009; Kakkar y Lee, 2010). Los mediadores liberados actúan de forma autocrina y/o paracrina con el fin de modular a los cardiomiocitos, a las células inflamatorias locales y a los fibroblastos cardíacos, y con ello exacerbar el remodelado cardíaco. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas más recientes han intentado atenuar la comunicación intercelular cardíaca patológica a través del enfoque en las citocinas, aunque hasta la fecha con un éxito clínico limitado (Dostal *et al.*, 2015).

Es cada vez más claro que la visión tradicional de las células cardíacas como sistemas aislados, más que como miembros de una red funcional dinámica, ha limitado la comprensión de la fisiopatología cardíaca. El conocimiento creciente de la compleja comunicación intercelular del tejido cardíaco será crucial en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para atenuar directamente la enfermedad cardíaca y la progresión de la insuficiencia cardíaca.



### III. HIPÓTESIS

Los miofibroblastos cardíacos disminuyen la expresión de la molécula *Ia* en los macrófagos peritoneales murinos, a través de mecanismos de contacto célula a célula (macrófago-miofibroblasto) y por la producción de factores solubles por parte del miofibroblasto. La expresión disminuida de *Ia* puede ser importante en la resolución espontánea de los procesos inflamatorios del corazón.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

Determinar el efecto *in vitro* de los miofibroblastos cardíacos murinos sobre la expresión de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (*Ia*) en macrófagos peritoneales.

#### 4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del contacto de los miofibroblastos cardíacos sobre la expresión de la molécula *Ia* en macrófagos peritoneales *Ia* positivos durante 3 días de co-cultivo.
2. Determinar el efecto del contacto de los miofibroblastos cardíacos sobre la expresión de la molécula *Ia* en macrófagos peritoneales *Ia* positivos durante 7 días de co-cultivo.
3. Cuantificar el efecto del medio condicionado por cultivos de miofibroblastos cardíacos sobre la expresión de la molécula *Ia* inducida por el interferón gamma en macrófagos peritoneales *Ia* negativos.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Animales de experimentación**

En esta investigación, se utilizaron ratas recién nacidas y ratas adultas machos de la cepa Lewis, con un peso corporal de 5-6 gramos y de 100-150 gramos, respectivamente (Bioterio del IVIC, Caracas, Venezuela).

Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” (Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela) de acuerdo con las directrices de Arrive y la guía del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicaciones de NIH No. 8023, revisada en 1978).

### **5.2. Aislamiento del tejido cardíaco de ratas neonatales de la cepa Lewis**

Los fibroblastos fueron obtenidos de la digestión enzimática del corazón de ratas recién nacidas de la cepa Lewis siguiendo el protocolo de Agocha y Eghbali-Webb, 1997. El enfoque enzimático permitió la disociación de los cardiomiocitos y los fibroblastos/miofibroblastos de los corazones de las ratas. Las células en el miocardio están unidas por interacciones de tipo célula a célula y célula a matriz extracelular. Aunque estas son interacciones débiles, colectivamente retienen a la población celular en el tejido ventricular.

En este estudio, las enzimas collagenasa tipo II y la tripsina se utilizaron para romper las adherencias entre las células y digerir la matriz extracelular. La collagenasa tipo II es utilizada para disociar las fibras de colágeno en el miocardio. La tripsina se ha utilizado ampliamente como agente disociador en protocolos de cultivos de células extraídas del tejido cardíaco de ratas neonatas y adultas (Harary y Farley, 1963). Por otra parte, la tripsina es una peptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas para generar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Esta enzima se

usa rutinariamente para disociar una variedad de tejidos, ya que escinde proteínas de la superficie celular, como las selectinas y las integrinas, que unen a las células entre sí o a la matriz extracelular.

A continuación, se detalla el procedimiento utilizado en esta investigación para el aislamiento del tejido cardíaco de las ratas neonatas:

1. Se preparó la solución enzimática conteniendo colagenasa tipo II (LS004174, Worthington Biochemical, Corp. NJ, EE. UU.) (**Anexo 1**). Se dispensaron 10 ml de esta solución en un tubo Falcon cónico estéril de 50 ml (Gibco, Grand Island, NY. USA), manteniéndose en hielo.
  2. Se esterilizó el kit de disección, constituido por: una tijera curva, una tijera recta y pinzas.
  3. Se colocaron dos placas de Petri estériles sobre hielo, dispensando 25 ml de PBS 0,001 M, pH 7.4 (**Anexo 1**) en cada placa.
  4. Diez (10) ratas de 2 días de nacidas fueron anestesiadas con éter y luego se limpiaron rápidamente en una solución de etanol al 75% para esterilizar la superficie.
  5. Los animales se decapitaron con tijeras estériles (rectas) y la piel se cortó a lo largo del esternón para permitir el acceso a la cavidad torácica y al corazón.
  6. Los corazones se extrajeron del cuerpo con tijeras curvas y se transfirieron inmediatamente a las placas de Petri conteniendo PBS, sobre hielo.
- Todos los pasos siguientes se realizaron en campana de flujo laminar estéril.
7. Se utilizó el bisturí para cortar los ventrículos del tejido cardíaco en trozos pequeños (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>), sobre hielo.
  8. Los ventrículos cortados fueron transferidos a un tubo Falcon cónico que contenía 10 ml de la solución enzimática e incubados por 20 minutos a 37°C con agitación suave.
  9. Se dejó sedimentar en posición vertical la solución enzimática con células por 15 minutos y se tomó el sobrenadante.

### 5.3. Cultivo de miofibroblastos cardíacos

1. El sobrenadante rico en las células objeto del estudio se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos en una centrífuga refrigerada.
2. El pellet (precipitado) de células se lavó tres veces con la solución de dispersión (**Anexo 1**).
3. El precipitado se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado (Whittaker Bioproducts MD, MA, USA) (**Anexo 1**).
4. La suspensión se trasvasó a un frasco de cultivo de 50 ml para su incubación por 90 minutos a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Los fibroblastos se separaron de los cardiomiocitos por adhesión diferencial, ya que los fibroblastos se unen preferentemente a la superficie del frasco de cultivo en este período de tiempo.
5. Se hizo la observación microscópica del frasco a sub-cultivar para verificar si la monocapa de células era continua y uniforme.
6. Fue insertada una pipeta de 2 ml en la manguera al vacío y se descartó el medio de cultivo del frasco.
7. Se hizo lavado 3 veces con PBS.
8. La monocapa se cubrió con cantidad suficiente de la solución de tripsina al 0.05% en HBS (0,5 ml aproximadamente) (T1426, Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO, EE. UU.) durante 10 minutos a 37°C, y luego las células se lavaron con medio RPMI 1640 suplementado y se replantaron.
9. Se tomó una alícuota para realizar el recuento celular. Para ello, se empleó la técnica de coloración con azul tripano (Kodak) (**Anexo 1**), ya que permite distinguir las células viables de las que no lo son. Estas últimas han perdido su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul, mientras que las células viables permanecen incoloras.

El recuento celular se realizó tomando una alícuota de la suspensión celular (50 µl) y mezclando con la solución de azul tripano (50 µl). La mezcla se dispensó con ayuda de una micropipeta en la cámara de Neubauer. Se contaron las células viables (brillantes, refringentes, no coloreadas) contenidas en los cuadrados.

**10.** Los miofibroblastos cardíacos resultaron positivos para los filamentos de vimentina y actina (Cramer *et al.*, 1997; Camelliti *et al.*, 2004) cuando se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón anti-vimentina de rata (M0725, Dako, Carpinteria, CA, EEUU) y monoclonales de ratón anti-actina de rata (MA1-10046, Dako, Carpinteria, CA, EEUU), respectivamente. La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio con sistema de epifluorescencia (Axioskop, Zeiss, Göttingen, Alemania).

Estos fibroblastos se utilizaron para los experimentos de co-cultivos después de 3 a 6 pasajes (miofibroblastos); en estos periodos no se detectaron células del miocardio.

#### **5.4. Inducción y aislamiento de la molécula *Ia* en macrófagos peritoneales**

El procedimiento para la inducción de la molécula del CMH *Ia* en macrófagos peritoneales de rata y su aislamiento se explica a continuación (Farr *et al.*, 1977):

1. Se preparó la solución bacteriana compuesta por:  $1 \times 10^6$  bacterias vivas de la cepa *Listeria monocytogenes* (American Type Culture Collection, USA) por mililitro en 3 ml de PBS estéril.
2. La solución bacteriana fue inyectada en ratas adultas a nivel intraperitoneal.
3. Después de 7 días, las células peritoneales fueron obtenidas inyectando 10 ml de HBS con HEPES 0,01M estéril y frío.
4. Las células recién extraídas fueron lavadas 3 veces mediante ciclos de centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos.
5. El pellet con las células se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado, para ser usadas para los ensayos de co-cultivos.
6. Una alícuota de la suspensión de macrófagos fue dispensada en cubreobjetos redondos de vidrio dentro de placas de 24 pozos (Costar, Cambridge MA, USA) incubándose durante 4 horas a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
7. Se hizo el lavado 3 veces con PBS.

8. Después de realizar el último lavado, las células adherentes resultantes estaban constituidas por 90-95% de células *Ia* positivas, como se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta (**Anexo 2**) usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-*Ia* de rata (YV0455-01, Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY, EEUU). Su especificidad ha sido ampliamente caracterizada (Schreiner *et al.*, 1981; Williams *et al.*, 1977; McMaster y Williams, 1979). Este anticuerpo reconoce los determinantes independientes del haplotipo de ratas Lewis (RT 1).

9. Para detectar los anticuerpos de ratón anti-*Ia* sobre las células, se utilizó un anticuerpo fluorescinado F(ab')<sub>2</sub> hecho en rata anti-IgG de ratón (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY, EEUU) como segundo anticuerpo.

El **control de marcaje negativo** consistió en sustituir el anticuerpo anti-*Ia* por una IgG de ratón electroforéticamente purificada proveniente de la línea del plasmocitoma MOPC 195 (Bionetics Laboratory Products, Litton Bionetics Inc., Kensington, MD, EE. UU.). La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio con sistema de epifluorescencia.

#### **5.5. Marcaje radiactivo del anticuerpo monoclonal anti-*Ia* de rata**

El anticuerpo monoclonal anti-*Ia* de rata fue marcado con el isótopo radiactivo <sup>125</sup>I siguiendo el protocolo descrito por Greenwood *et al.*, 1963; como se detalla a continuación:

1. El anticuerpo monoclonal anti-*Ia* (400 µg) fue marcado con <sup>125</sup>I usando una solución de 10 mCi Na <sup>125</sup>I (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, EEUU) y 0,75 mg de cloramina T en 0,75 ml de PBS.
2. Se procedió a incubar por 30 minutos en hielo.
3. La reacción se detuvo con 0,75 mg de metabisulfito de sodio.

4. La mezcla de reacción se cargó en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals), para separar el anticuerpo de las moléculas de  $^{125}\text{I}$  que no reaccionaron.

5. Se midió la actividad radiactiva. El 99% de la radiactividad se asoció con el 10% de la proteína precipitada con el ácido tricloroacético.

La actividad específica de los anticuerpos yodados por este medio osciló entre 5 y 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de proteína.

#### 5.6. Determinación de proteínas

El contenido total de proteínas se midió en los homogenizados de los cultivos por el ensayo del ácido bicinconínico (Wiehelman *et al.*, 1988). Este método se fundamenta en la capacidad que tienen las proteínas de reducir los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) del reactivo del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^{+1}$ ) en un medio básico. Durante la reacción, dos moléculas de BCA reaccionan con una del ión  $\text{Cu}^{+1}$ . La cantidad de  $\text{Cu}^{+2}$  reducido es función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución inicialmente verde al color púrpura, con capacidad de absorber luz a una longitud de onda de 562 nm. La absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución.

#### 5.7. Experimentos para determinar el efecto del contacto con los miofibroblastos en la expresión de *Ia* en macrófagos peritoneales

Con el fin de evaluar la modulación de la molécula *Ia* en los macrófagos después de ponerlos en contacto con los miofibroblastos, los cultivos celulares sub-confluentes de miofibroblastos fueron cultivados conjuntamente con los macrófagos previamente estimulados con *Listeria monocytogenes*.

### 5.7.1. Estudios de inmunofluorescencia

1. En las placas de 24 pozos conteniendo los miofibroblastos sub-confluentes sobre cubreobjetos redondos, se inocularon macrófagos *Ia* positivos a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml/pozo.
2. Se sometió a incubación durante 4 horas a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
3. Las células no adherentes fueron removidas por lavado con medio RPMI 1640 más HEPES 0,01 M.
4. Los co-cultivos se incubaron durante 3 y 7 días a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 suplementado.
5. Las células se fijaron a los cubreobjetos con 2% de paraformaldehído en PBS.
6. Se tomó una alícuota para determinar la viabilidad celular por exclusión del azul tripano.
7. La expresión de *Ia* fue determinada por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-*Ia* de rata.
8. Para detectar los anticuerpos de ratón anti-*Ia* sobre las células, se utilizó un anticuerpo fluorescinado F(ab')<sub>2</sub> hecho en rata anti-IgG de ratón como segundo anticuerpo.

Se procedió a realizar el **control de marcaje negativo** tal como se describió anteriormente (acápite 5.4).

Como **control negativo del co-cultivo celular**, se procedió a realizar el mismo procedimiento, pero inoculando los macrófagos *Ia* positivos ( $5 \times 10^5$  células/ml/pozo) en las placas de 24 pozos *sin* la presencia miofibroblastos.

### **Experimento complementario**

Con el propósito de analizar la expresión de *Ia* resultante en células libres después del contacto con los miofibroblastos, se realizó un segundo experimento



siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. Los co-cultivos de macrófagos y miofibroblastos de 3 días, se trataron con una solución enzimática conteniendo colagenasa tipo II durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados con PBS, se realizó una tinción doble para *Ia* y expresión de CD14 en las células desprendidas. A este respecto, la expresión de *Ia* se determinó como se describió anteriormente y la expresión de CD14 se determinó utilizando un anticuerpo anti-CD14 de rata hecho en conejo conjugado con biotina (Biocompare, San Francisco, CA, EE.UU.), seguido de estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Como control negativo, se realizó la misma evaluación en cultivo de macrófagos *sin* la presencia de miofibroblastos. La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio con sistema epifluorescente.

#### **5.7.2. Análisis mediante radioinmunoensayo**

Además del análisis con inmunofluorescencia, la expresión de *Ia* también se determinó mediante radioinmunoensayo. Los co-cultivos de macrófagos y miofibroblastos se analizaron como se detalla a continuación:

1. Se preparó una suspensión celular ajustada a  $5 \times 10^5$ /células/ml conteniendo cultivos de miofibroblastos sub-confluentes con macrófagos *Ia* positivos estimulados con *Listeria monocytogenes*.
2. En las placas flexibles de microdilución de 96 pozos (Flow Laboratories, McLean, VA, EEUU), se inocularon 100 µl de la suspensión celular preparada.
3. Se sometió a incubación durante 4 horas a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
4. Las células no adherentes fueron removidas por lavado con medio RPMI 1640 más HEPES 0,01 M.
5. Los co-cultivos se incubaron durante 3 y 7 días a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 suplementado.

6. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS.
7. Se tomó una alícuota para determinar la viabilidad celular por exclusión del azul tripano.
8. La expresión de *Ia* fue determinada por radioinmunoanálisis utilizando 50  $\mu$ l de un anticuerpo monoclonal anti-*Ia* de rata marcado con  $^{125}$ I en HBS con albúmina de suero bovino al 10% y suero normal de rata al 10% (pH 7.2). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
9. Los anticuerpos no unidos fueron removidos al efectuar lavados con PBS.
10. Los pozos de la placa se obtuvieron cortándolos con un alambre caliente.
11. Los valores de radiactividad asociados a las células de cada pozo se determinaron utilizando un contador gamma (Beckman, Pasadena, CA, EE. UU.).
12. Para normalizar los valores de irradiación, se determinaron las proteínas totales para cada pozo obtenido.

Se procedió a realizar el **control de marcaje negativo** tal como se describió anteriormente (acápite 5.4).

**5.8. Experimentos para determinar el efecto del (los) factor(es) soluble(s) producido(s) por los miofibroblastos sobre la expresión de *Ia* en macrófagos peritoneales inducidos por interferón gamma**

**5.8.1. *Cultivos de macrófagos con interferón gamma (IFN- $\gamma$ )***

1. Se preparó la solución compuesta por: 3% de proteosa peptona (82450, Sigma Chemical. St. Louis.MO, EE.UU.), en 3 ml de PBS estéril.
2. La solución preparada fue inyectada en ratas adultas a nivel intraperitoneal.
3. Después de 4 días, las células peritoneales fueron obtenidas inyectando 10 ml de HBS con HEPES 0,01M estéril y frío.

4. Las células recién extraídas fueron lavadas 3 veces mediante ciclos de centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos.
5. El pellet con las células se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado.
6. Una alícuota de la suspensión de macrófagos se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml.
7. Se dispensaron 100  $\mu$ l de la suspensión celular en placas flexibles de microdilución de 96 pozos incubándose durante 4 horas a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Se hicieron 3 lavados con PBS para eliminar las células no adheridas.
9. Después de realizar el último lavado, las células se incubaron con diferentes concentraciones de interferón gamma recombinante (Genentech Inc., So. San Francisco, CA, EEUU); a saber: 50 ng/ml (concentración inicial), 25, 12.5, 6.25 y 3.13 ng/ml (concentración final) y se cultivaron durante 3 días a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
10. La expresión de *Ia* en la superficie celular se determinó mediante radioinmunoanálisis como se describió anteriormente (acápite 5.7.2). Los valores experimentales se representaron como el promedio de los ensayos realizados por triplicado.

Se procedió a realizar el **control de marcaje negativo** tal como se describió anteriormente (acápite 5.4).

#### ***5.8.2. Cultivos de macrófagos con interferón gamma y medio condicionado por miofibroblastos***

1. Una alícuota de la suspensión de macrófagos peritoneales estimulados con proteosa peptona (acápite 5.8.1) se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml.

2. Se dispensaron 100  $\mu$ l de la suspensión celular en placas flexibles de microdilución de 96 pozos incubándose durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
3. Se hicieron 3 lavados con PBS para eliminar las células no adheridas.
4. Después de realizar el último lavado, las células se incubaron con interferón gamma recombinante a una concentración final de 30 ng/ml. Se agregó medio condicionado por miofibroblastos (a partir de cultivos de miofibroblastos de 3 días) utilizando diferentes diluciones en medio RPMI 1640 suplementado; a saber: 0, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
5. Se dejó incubando durante 3 días a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
6. Los macrófagos cultivados fueron lavados con PBS y fijados con 2% de paraformaldehído en PBS.
7. La expresión de *Ia* en la superficie celular se determinó mediante radioinmunoanálisis como se describió anteriormente (acápite 5.7.2). Los valores experimentales se representaron como el promedio de los ensayos realizados por triplicado.

Se procedió a realizar el **control de marcaje negativo** tal como se describió anteriormente (acápite 5.4).

## 5.9. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DE de cinco experimentos independientes. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test t no pareado y el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El valor de  $p < 0.05$  de dos colas fue considerado significativo.

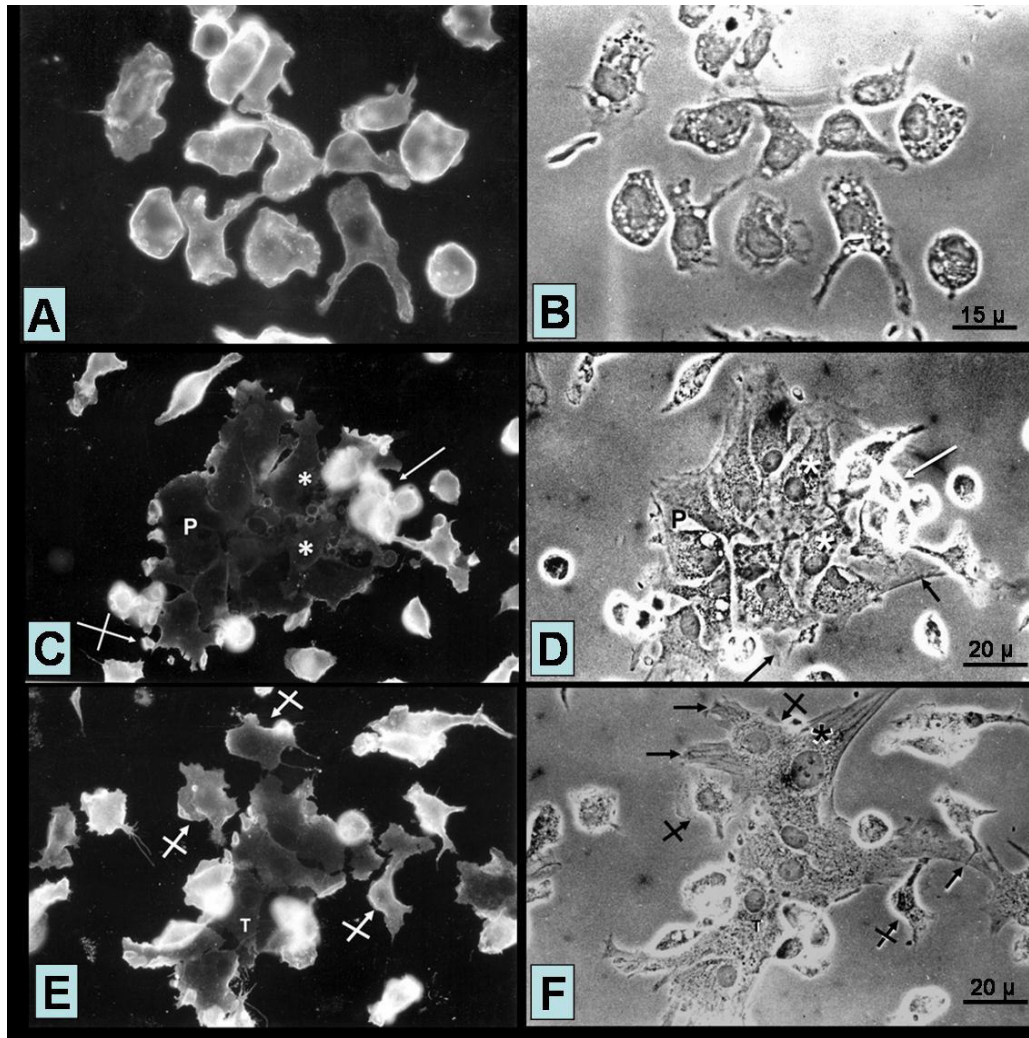
## VI. RESULTADOS

### **6.1. Efecto del contacto del miofibroblasto sobre la expresión de la molécula *Ia* en los macrófagos peritoneales *Ia* positivos durante 3 y 7 días de co-cultivo**

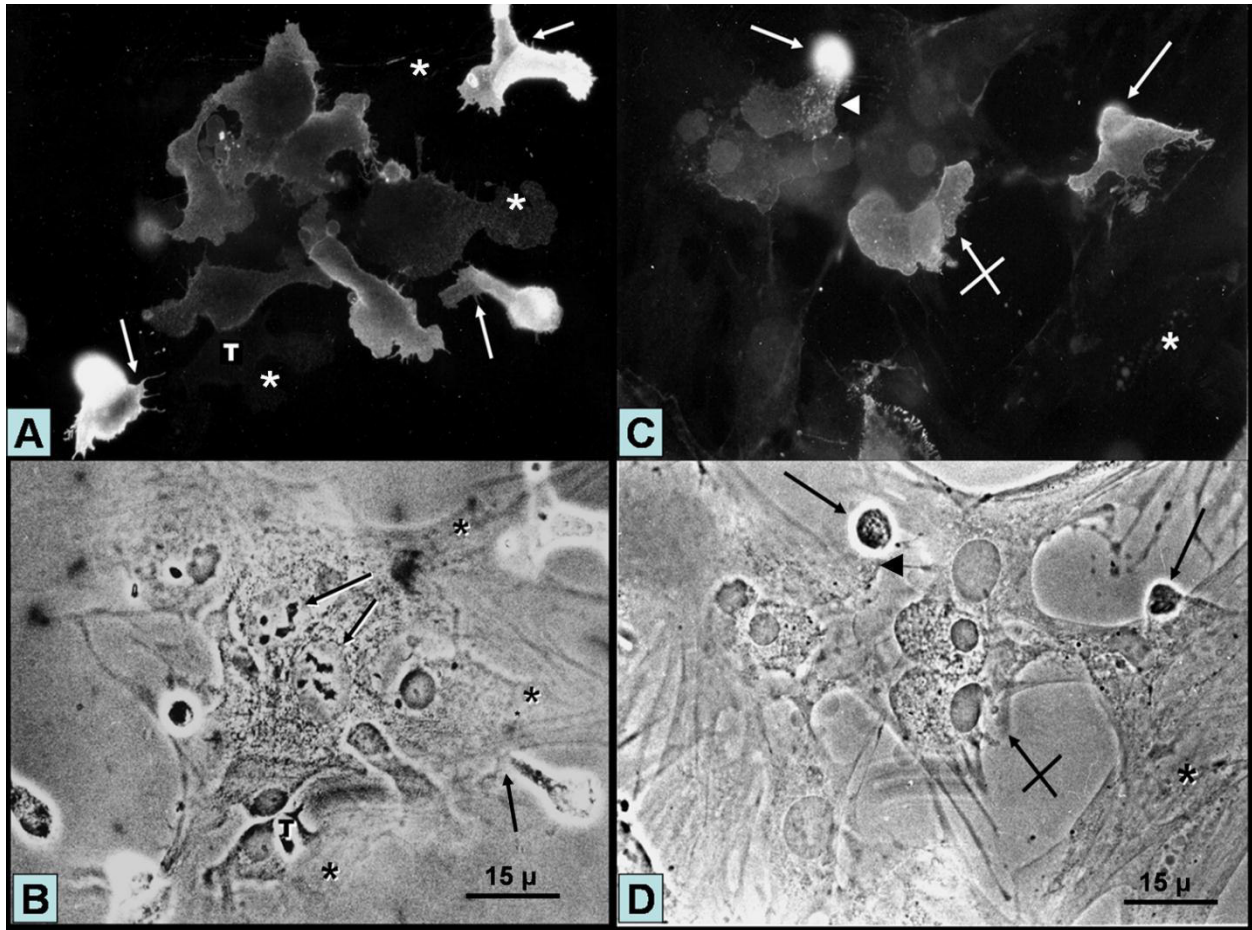
En este estudio, la expresión de la molécula *Ia* en ratas fue evaluada en los macrófagos previamente estimulados por *L. monocytogenes*, adheridos a los miofibroblastos cardíacos, y se compararon con los macrófagos no adheridos y los macrófagos cultivados sin miofibroblastos. En el día 3 del co-cultivo, se observaron grupos de macrófagos fijados a la superficie del miofibroblasto. Con frecuencia, los macrófagos se encontraban fijados a un costado o sobre la superficie del miofibroblasto; en este último caso, los macrófagos mostraron una tendencia a cubrir totalmente la superficie del miofibroblasto (Figura 1).

Los cultivos de tres días de macrófagos estimulados por *L. monocytogenes* mostraron células con un patrón de tinción positiva periférica e intensa de la molécula *Ia* (Figura 1A). En general, los macrófagos adheridos a la superficie de los miofibroblastos mostraron una reactividad negativa o disminuida al anticuerpo monoclonal anti-*Ia* al compararlos con los macrófagos no unidos o macrófagos cultivados en cubreobjetos sin miofibroblastos (Figuras 1-3).

Los macrófagos localizados en el centro de las agrupaciones de miofibroblastos mostraron reactividad negativa o disminuida a la molécula *Ia*, mientras que los macrófagos unidos en la periferia exhibieron zonas polarizadas de positividad a esta molécula (Figura 2). Además, algunos macrófagos *Ia* positivos unidos a los miofibroblastos, mostraron una reactividad negativa o disminuida a *Ia* en el área del contacto celular (Figuras 2 y 3). Los macrófagos libres *Ia* positivos (no unidos a los miofibroblastos) en contacto con otros macrófagos no mostraron reactividad disminuida o negativa (Figura 3).

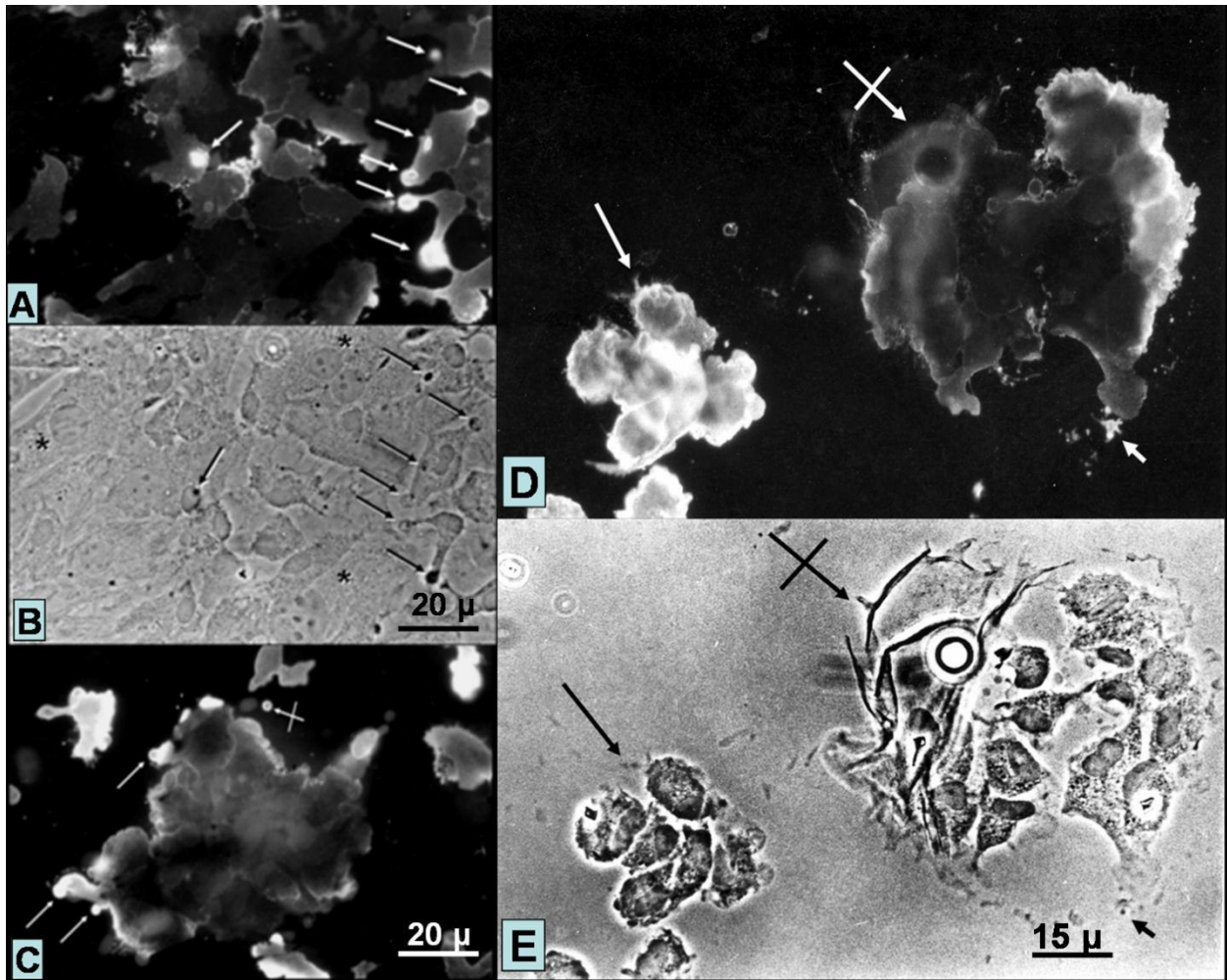


**Figura 1.** Hallazgos de inmunofluorescencia a los 3 días del cultivo de macrófagos peritoneales tratados con *Listeria monocytogenes* y los co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos cardíacos. **A)** Macrófagos Ia positivos obtenidos del cultivo de macrófagos estimulados con *Listeria monocytogenes*. **B)** Morfología de macrófagos activados obtenidos del cultivo de macrófagos estimulados con *Listeria monocytogenes*. **C)** Co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos; varios macrófagos se ubican sobre la superficie de un grupo de miofibroblastos, mostrando una disminución (P) o ausencia de expresión de Ia (asteriscos) en comparación con los macrófagos no unidos. La flecha muestra un agrupamiento de macrófagos con elevada positividad Ia fijado al borde del miofibroblasto, y la flecha en cruz muestra un posible alargamiento de la membrana (*blebbing*) y desprendimiento (*shedding*) de fragmentos citoplasmáticos Ia positivos. **D)** Varios macrófagos se ubican sobre la superficie del miofibroblasto. La letra P y asteriscos muestran, respectivamente, los macrófagos con disminución parcial y total de la expresión de Ia observada en C. La flecha blanca muestra una agrupación de macrófagos fijado al borde del miofibroblasto, y las flechas negras pequeñas muestran prolongaciones del citoplasma de los miofibroblastos. **E)** Las flechas cruzadas muestran varios macrófagos que exhiben una disminución de la expresión de Ia en el citoplasma unido a los miofibroblastos. T: Macrófago Ia negativo. **F)** Las flechas cruzadas muestran macrófagos unidos que son parcialmente Ia positivos en E. T: Macrófago que es Ia totalmente negativo en E. El asterisco muestra una porción del núcleo y del citoplasma de un miofibroblasto. Las flechas muestran las prolongaciones del miofibroblasto. Nótese que los miofibroblastos no reaccionaron con los anticuerpos anti-Ia. Inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ia de rata y un anticuerpo fluoresceinado F(ab')<sub>2</sub> hecho en rata anti-IgG de ratón. Microscopía de contraste de fases. Magnificación original: 1000x.



**Figura 2.** Hallazgos de inmunofluorescencia a partir de los 3 días del co-cultivo de macrófagos peritoneales tratados con *Listeria monocytogenes*: miofibroblastos cardíacos. **A)** Macrófagos *Ia* positivos y macrófagos *Ia* parcialmente positivos sobre un grupo de miofibroblastos. Las flechas muestran una demarcación clara de la baja intensidad de la expresión de *Ia* en el punto de contacto con el miofibroblasto. T: Macrófago *Ia* negativo. Asterisco: zona de miofibroblasto *Ia* negativa. **B)** Las flechas muestran dos núcleos de miofibroblastos. Los asteriscos muestran el citoplasma del miofibroblasto. T: Macrófago que es *Ia* negativo en A. **C)** Macrófagos *Ia* parcialmente positivos y macrófagos *Ia* negativos en un grupo de miofibroblastos. Las flechas muestran una intensa acumulación polarizada de la reactividad a la molécula *Ia* en macrófagos unidos, lo que sugiere *capping* de la molécula. La punta de flecha muestra la localización granular de *Ia*, lo que sugiere acumulación en parches de esta molécula (*patching*). La flecha cruzada muestra dos macrófagos, uno *Ia* negativo y otro parcialmente positivo. Los asteriscos muestran el citoplasma del miofibroblasto, *Ia* negativo. **D)** Las manchas densas en el citoplasma de los macrófagos (flechas) corresponden a la expresión intensa de *Ia* observada en C. La flecha cruzada muestra dos macrófagos que corresponden a macrófagos *Ia* negativos y parcialmente positivos observados en C. Los asteriscos muestran el citoplasma de miofibroblastos. Inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-*Ia* de rata y un anticuerpo fluoresceinado F(ab')<sub>2</sub> hecho en rata anti-IgG de ratón. Microscopía de contraste de fases. Magnificación original: 1000x.



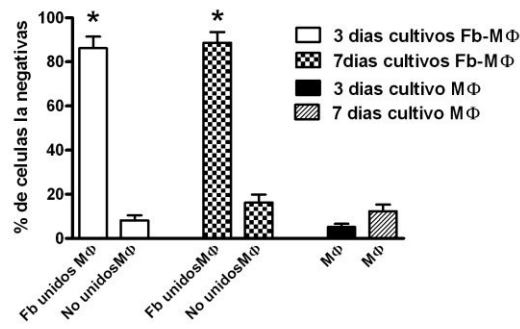


**Figura 3.** Hallazgos de inmunofluorescencia a partir de 7 días del co-cultivo de macrófagos peritoneales tratados con *Listeria monocytogenes*; miofibroblastos cardíacos. **A)** Amplia polarización de Ia (*capping*) en macrófagos unidos (flechas). Observe la positividad parcial y negativa de Ia en los macrófagos unidos y la negatividad de Ia en los miofibroblastos. **B)** Las flechas muestran estructuras densas en las prolongaciones del citoplasma de macrófagos (*blebbing* de membrana) que se corresponden con la expresión de Ia polarizada de alta intensidad en A. Los asteriscos muestran miofibroblastos. **C)** Varios macrófagos unidos a un grupo de miofibroblastos que muestran la expresión de Ia positiva parcial y negativa. Las flechas muestran varias expresiones de Ia intensas localizadas (*capping*) en macrófagos unidos y desprendimiento (*shedding*) del citoplasma Ia positivo (flecha cruzada). **D y E,** muestran el grupo de macrófagos (flecha) donde la distribución alterada de las moléculas Ia no está presente en comparación con los macrófagos unidos a miofibroblastos (flecha cruzada). La flecha pequeña muestra el desprendimiento del citoplasma Ia positivo. Inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti- Ia de rata y un anticuerpo fluoresceinado F(ab')<sub>2</sub> hecho en rata anti-IgG de ratón. Microscopía de contraste de fases. Magnificación original: 1000x.

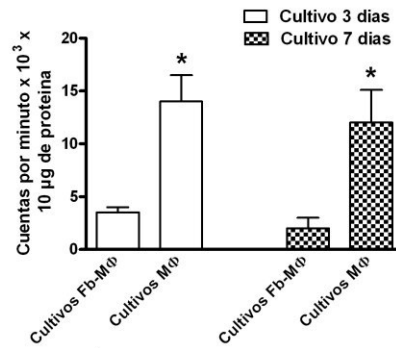


Al transcurrir siete días del co-cultivo, se observaron macrófagos que permanecían unidos a capas confluentes o semi-confluentes de miofibroblastos. En el día 7, los macrófagos cultivados sin miofibroblastos mostraron muchas células desprendidas, sin embargo, los macrófagos restantes aún eran *Ia* positivos. Como resultados comunes en los co-cultivos de 3 y 7 días, se observaron estructuras densas en prolongaciones distales del citoplasma (*blebbing*) de los macrófagos que se corresponden con la expresión de alta intensidad de *Ia* polarizada (*capping*) (Figuras 2C, 2D, 3A y 3B). En algunos casos, también se observó desprendimiento (*shedding*) de porciones de citoplasma de macrófagos *Ia* positivos (Figuras 1C y 3C).

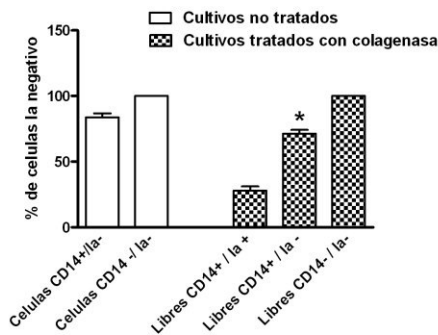
En la Figura 4A se resumen los datos obtenidos a partir de los cultivos de macrófagos y los co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos. Se observó un alto porcentaje ( $p < 0,001$ ) de macrófagos con reactividad negativa o disminuida a la molécula *Ia*, unidos a miofibroblastos en comparación con los macrófagos no unidos o macrófagos cultivados sin miofibroblastos. Esto fue confirmado por la disminución de la actividad radiactiva (anticuerpo anti-*Ia* marcado con  $^{125}\text{I}$ ) en co-cultivos de macrófagos: miofibroblastos en comparación con los cultivos de macrófagos solos ( $p < 0,001$ ) (Figura 4B). La Figura 4C muestra los datos de miofibroblastos y macrófagos desprendidos después del tratamiento con colagenasa a los co-cultivos de 3 y 7 días de macrófagos: miofibroblastos. Se observaron valores similares en las células desprendidas en comparación con las células cultivadas en cubreobjetos. La doble tinción para *Ia* y CD14 (marcador para monocitos/macrófagos) mostró que solo las células positivas para CD14 expresaban la molécula *Ia*.



**A** \*p<0.001 vs. el resto de los grupos



**B** \*p<0.001 vs. cultivos Fb-MΦ



**C** \*p<0.001 vs. celulas CD14+/Ia+

**Figura 4.** Efecto del contacto celular en la expresión de *Ia* en macrófagos. **A)** Disminución de la expresión de *Ia* en macrófagos unidos a miofibroblastos después de 3 y 7 días de cultivo. Los valores representan el porcentaje de células que han perdido parcial o completamente la reactividad al anticuerpo monoclonal anti-*Ia*. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cinco experimentos independientes y se analizan mediante una prueba t no pareada. **B)** Se observa disminución en las cuentas de radiactividad en los cultivos de miofibroblastos: macrófagos en comparación a los cultivos de macrófagos solos a los 3 y 7 días de cultivo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cinco experimentos independientes y se analizan mediante una prueba t no pareada. **C)** Las células desprendidas de los cultivos tratados con collagenasa mostraron un porcentaje reducido de células positivas para CD14+/ *Ia*+ y alto porcentaje de células CD14+/ *Ia*-. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cinco experimentos independientes y se analizan mediante una prueba t no pareada. MΦ: macrófagos estimulados con *Listeria monocytogenes*. Fb: miofibroblasto cardíaco.

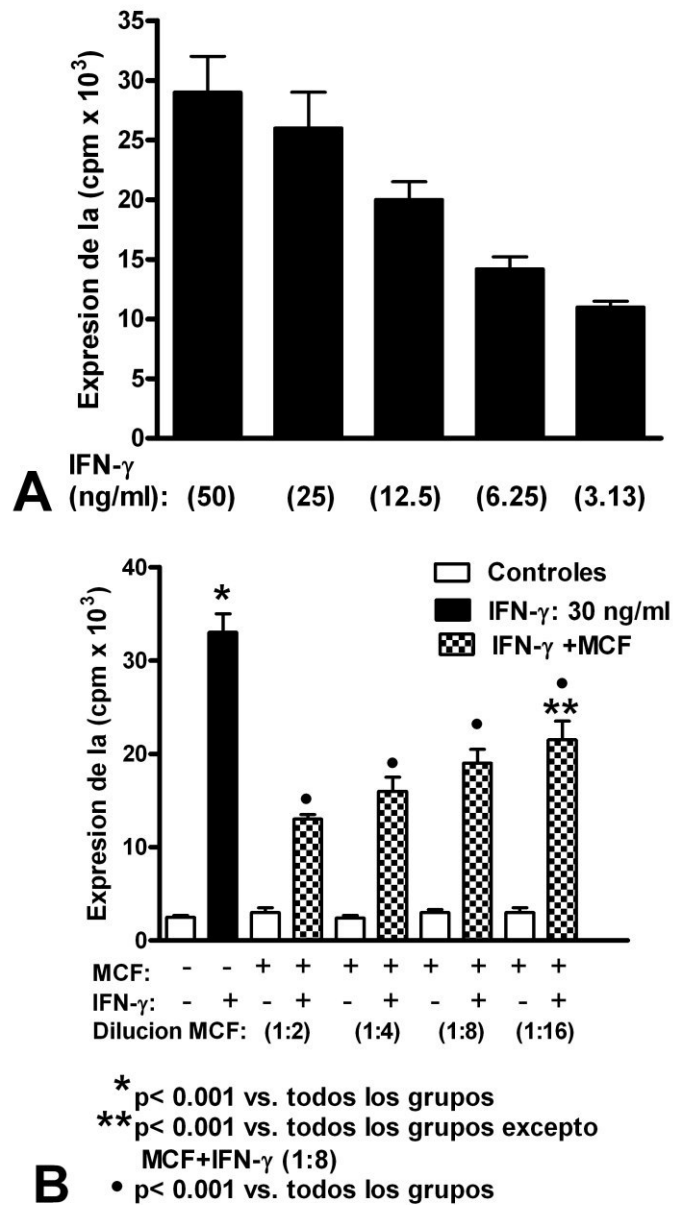
## **6.2. Efecto del medio condicionado por cultivos de miofibroblastos sobre la expresión de la molécula *Ia* inducida por el interferón gamma en macrófagos peritoneales *Ia* negativos**

Como era de esperarse, la Figura 5A muestra un aumento de la expresión de *Ia* en los macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  en una forma directamente proporcional a la dosis de IFN- $\gamma$ . Se observó una mayor expresión de *Ia* en las dosis de 50 y 25 ng/ml. Por lo tanto, se utilizaron 30 ng/ml para determinar el efecto del medio condicionado por miofibroblastos sobre la expresión de *Ia*. Como se observa en la Figura 5B, se encontró disminución de la expresión de la molécula *Ia* en los macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y diferentes diluciones del medio condicionado por miofibroblastos en una manera dependiente de la dilución del medio condicionado (dilución/% de supresión: 1:2/60.7; 1:4/51.52; 1:8/42.42; 1:16/34.85).

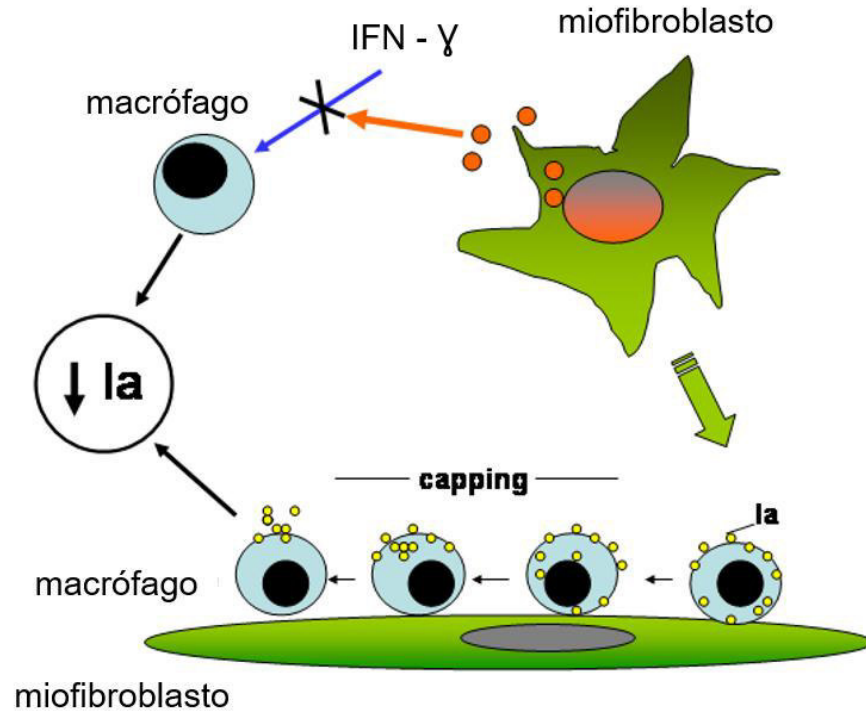
## **6.3. Resumen de los efectos del miofibroblasto cardíaco sobre la expresión de la molécula *Ia* en macrófagos peritoneales**

La Figura 6 plantea un esquema general de los hallazgos obtenidos en este estudio. Por una parte, se demostró que la interacción de los miofibroblastos cardíacos con los macrófagos induce la expresión disminuida de la molécula *Ia* en los macrófagos por contacto célula a célula. Y por la otra, los resultados revelaron la existencia de factores producidos por los miofibroblastos que inhiben la expresión de *Ia* en los macrófagos inducidos por interferón- $\gamma$ .

Adicionalmente, el contacto célula a célula, producto de la interacción entre los miofibroblastos y los macrófagos, estimula la polarización de las moléculas *Ia* (*capping*) y elongación de la membrana citoplasmática (*blebbing*) de los macrófagos, con el consiguiente desprendimiento de fragmentos citoplasmáticos *Ia* positivos (*blebbing*) en estas células. Estos fenómenos se observaron tanto en los co-cultivos de 3 días como en los de 7 días.



**Figura 5.** Efecto del medio condicionado por fibroblastos (MCF) en la expresión de *Ia* inducida por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en macrófagos obtenidos con proteosa peptona. **A)** Expresión de *Ia* inducida por IFN- $\gamma$ ; se observó una inducción dosis-dependiente de la molécula. Los macrófagos fueron tratados con IFN- $\gamma$  durante 3 días. **B)** Expresión de *Ia* en cultivos de macrófagos estimulados con IFN- $\gamma$  (30 ng/ml) y tratados con diferentes diluciones de MCF durante 3 días. Se aprecia efecto inhibitor dosis dependiente de la expresión de *Ia* en los cultivos tratados con MCF. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó mediante ANOVA no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn.



**Figura 6.** Esquema del efecto del miofibroblasto cardíaco en la expresión de la molécula *Ia*. Mecanismos de contacto celular y de producción de sustancias inhibidoras de la expresión de *Ia*.

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. Efecto del contacto del miofibroblasto sobre la expresión de la molécula *Ia* en los macrófagos peritoneales *Ia* positivos durante 3 y 7 días de co-cultivo

Los antígenos *Ia* juegan un papel fundamental en la función inmunorreguladora de los macrófagos y otras células accesorias. La expresión de *Ia* por macrófagos puede ser transitoria (disminuye significativamente después de 1 día de cultivo), o bien, puede ser un fenómeno continuo (Vespa *et al.*, 1987; Mori y Hayward, 1984). La expresión continua de *Ia* por los macrófagos puede ser suprimida por algunos agentes como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano (Vespa *et al.*, 1987).

En este estudio, los datos demostraron que la expresión de *Ia* en macrófagos también puede disminuir cuando estas células se unen a la superficie de los miofibroblastos. El análisis de inmunofluorescencia sugiere un proceso de redistribución (*capping*) de la molécula *Ia* en la superficie de los macrófagos que conllevó al alargamiento localizado de su membrana citoplasmática (*blebbing*) y desprendimiento (*shedding*) de *Ia*.

Es posible que la reorganización de *Ia* en la membrana del macrófago tras la interacción con la superficie de los miofibroblastos pueda favorecer la aglutinación de las moléculas *Ia* en un polo de la célula (*capping*) con la consiguiente liberación (*shedding*) de esta molécula. La mayoría de las proteínas integrales de las membranas parecen existir como moléculas individuales que son independientemente móviles en el plano de la membrana (Singer, 1982) y la unión transcelular de dos proteínas integrales de membrana (es decir, el contacto durante las interacciones célula-célula) a menudo puede conducir a la redistribución mutua en sus respectivas membranas fluidas (conocido también como *co-capping*) (Kupfer y Singer, 1989).

Se ha demostrado que las partículas unidas a la superficie dorsal del fibroblasto se pueden transportar en reversa como un mecanismo de rápido ensamblaje de una nueva superficie (Harris y Dunn, 1972; Abercrombie *et al.*, 1970). Dado que el entrecruzamiento de los receptores del antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) está asociado a los filamentos de actina durante el proceso de *capping* (Fernández *et al.*, 2003), ambos mecanismos, la unión de los macrófagos a los miofibroblastos y la redistribución de los filamentos de actina podrían estar implicados en el *capping* de la molécula *Ia*. En este sentido, los miofibroblastos resultaron altamente positivos para la actina cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-actina en este estudio, lo que sugiere un posible papel de esta proteína en la distribución de *Ia*.

El recubrimiento de la membrana de los macrófagos por los miofibroblastos durante los co-cultivos ocultando la molécula *Ia*, podría explicar la disminución de la reactividad de *Ia* en los macrófagos unidos a los miofibroblastos. Sin embargo, descartamos esta posibilidad, ya que los macrófagos y las suspensiones de miofibroblastos obtenidos después del tratamiento de los co-cultivos con la enzima colagenasa, mostraron una disminución de la expresión de *Ia* en los macrófagos similar a la observada en los co-cultivos donde las células permanecieron adheridas.

En lo que respecta a la variabilidad en la expresión de la molécula *Ia* del CMH clase II en los macrófagos observada por inmunofluorescencia indirecta, ello podría deberse a la confluencia del co-cultivo celular. El hecho de que las células sean cuerpos tridimensionales y de que, además, la confluencia observada en los cultivos celulares implique la interacción asimétrica del contacto intercelular, podría conllevar a dos posibles variantes de unión intercelular: tipo **mácula** (que implica un sistema de unión que se limita a una pequeña superficie circular de la célula), y/o tipo **zónula** (un sistema de unión que adopta la forma de una banda extendida sobre una gran longitud correspondiente a toda la circunferencia de la célula) (Hüttner *l.*, 1982). Ello podría explicar la disminución parcial (unión tipo *mácula* entre las membranas celulares del macrófago y el miofibroblasto) o total (unión tipo *zónula* entre las

membranas celulares del macrófago y el miofibroblasto) de la expresión de la molécula *Ia* por parte de los macrófagos.

Dado que los macrófagos no unidos en los co-cultivos celulares seguían expresando *Ia* con una alta positividad, es probable que no haya participación de factores inhibidores solubles secretados por los miofibroblastos que causaran disminución de la expresión de *Ia* en los macrófagos unidos. En este respecto, se ha demostrado que las moléculas inhibidoras de la inducción, como la prostaglandina E2 (PGE2), producida por los fibroblastos (Tashjian *et al.*, 1975), no afectan la expresión de *Ia* en los macrófagos que expresan continuamente esta molécula (Vespa *et al.*, 1987). Como se muestra en nuestros resultados, los macrófagos obtenidos después de la inyección peritoneal de *L. monocytogenes*, expresaron de forma continua el antígeno *Ia* por hasta 7 días de cultivo. Estos datos sugieren que una vez que el macrófago expresa *Ia*, el miofibroblasto cardíaco no es capaz de disminuir su expresión por la producción de inhibidores solubles.

## **7.2. Efecto del medio condicionado por cultivos de miofibroblastos sobre la expresión de la molécula *Ia* inducida por el interferón gamma en macrófagos peritoneales *Ia* negativos**

Las reacciones inmunológicas *in vivo*, ocurren en un ambiente rico en fibroblastos y otras células del tejido conectivo. Es bien conocida la importancia de la expresión de *Ia* en la superficie de los macrófagos para funcionar como células presentadoras de antígenos durante la inducción o el aumento de la respuesta inmunitaria (Reis e Sousa y Unanue, 2014). Dado que el contacto con los miofibroblastos puede transformar a los macrófagos *Ia* positivos en *Ia* negativos, este mecanismo puede ser importante en la regulación de la respuesta inmunológica y la inflamación a nivel del tejido conectivo, donde los monocitos/macrófagos *Ia* positivos locales o infiltrantes podrían tener contacto con los miofibroblastos.



Sin embargo, los macrófagos *Ia* negativos podrían ser parte de la población de monocitos/macrófagos durante la inflamación (Honda *et al.*, 1985), y además del reclutamiento de monocitos derivados de la sangre, los macrófagos residentes en el tejido del corazón representan otra fuente de células inmunitarias innatas, que probablemente contribuyen al proceso inflamatorio local (Epelman *et al.*, 2014). Estas células podrían ser inducidas a expresar la molécula *Ia* mediante citocinas como el interferón- $\gamma$  (Pinto *et al.*, 2014). En este estudio, el medio condicionado por miofibroblastos disminuyó la respuesta de los macrófagos a la expresión de moléculas *Ia* inducidas por interferón- $\gamma$ , lo que sugiere la presencia de uno o más factores inhibidores solubles secretados por los miofibroblastos cardíacos. Esto sería otro mecanismo de control de la expresión de la molécula *Ia* que ayudaría a disminuir el proceso inflamatorio en el caso de la miocarditis.

El (los) factor(es) inhibitorio(s) no fue (fueron) identificado(s), sin embargo, se ha documentado que las prostaglandinas de la serie E (PGE) son potentes inhibidores de la expresión de los antígenos *Ia* en los macrófagos (Snyder *et al.*, 1982) y esos inhibidores son producidos por los fibroblastos (Tashjian *et al.*, 1975). Por lo tanto, el efecto inhibitorio sobre la expresión de *Ia* en los macrófagos reportado en esta investigación podría implicar la producción de PGE2. Al respecto, hallazgos similares a este estudio han sido reportados previamente. El medio condicionado por cultivos de *Entamoeba histolytica* disminuyó la expresión de *Ia* en macrófagos inducidos por interferón- $\gamma$ , pero no tuvo efecto sobre las moléculas *Ia* ya expresadas en superficie celular; este efecto estaba relacionado con la acción de la PGE2 (Wang y Chadee, 1995). Sin embargo, el papel regulador negativo sobre la expresión de *Ia* por mecanismos independientes de la producción de PGE2 también ha sido reportado (Johnson *et al.*, 1989).

Una vez producida la lesión cardíaca, los fibroblastos son estimulados tanto mecánica como químicamente por las citocinas inflamatorias para transformarse en el fenotipo de miofibroblastos (Eyden, 2008; Souders *et al.*, 2009). Los mecanismos de transformación *in vivo* de los fibroblastos no son bien conocidos. Sin embargo, los

estudios *in vitro* realizados con cultivos de fibroblastos han demostrado que los marcadores de estas células están presentes en los cultivos de pasajes tempranos, pero en los pasajes sucesivos las células comienzan a transformarse en miofibroblastos, lo que sugiere que los cultivos de fibroblastos son representativos de los cultivos de miofibroblastos cuando se utiliza el tercer o más pasajes de cultivo (Santiago *et al.*, 2010).

La diferenciación del fenotipo de miofibroblasto se caracteriza por la expresión de actina del músculo liso y de vimentina (Gabbiani, 2003; Frangogiannis *et al.*, 2000; Rohr, 2009). En este estudio, los fibroblastos se utilizaron después de 3 a 6 pasajes y resultaron positivos para vimentina y filamentos de actina, confirmando así que se trataba de cultivos de miofibroblastos. En vista de que la transformación de los fibroblastos en su fenotipo activado puede tener lugar durante los eventos inflamatorios del corazón, la interacción de los miofibroblastos con los monocitos/macrófagos demostrados en este estudio resulta aún más relevante.

En general, este estudio demuestra que la interacción de los miofibroblastos cardíacos con los monocitos/macrófagos induce la expresión disminuida de la molécula *Ia* en los macrófagos por contacto célula a célula y por factores inhibidores que disminuyen la expresión de *Ia* inducida por interferón- $\gamma$  (Figura 6). Estos efectos podrían ser importantes en la resolución de los procesos inflamatorios del miocardio.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La interacción *in vitro* de los miofibroblastos cardíacos con los macrófagos induce la disminución de la expresión de la molécula *Ia* del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH II) en los macrófagos por contacto célula a célula.
2. La producción de sustancias inhibitoras de la expresión de *Ia* del CMH II por parte del miofibroblasto bloquea el efecto inductor del interferón gamma sobre *Ia*.
3. El tratamiento con 30 ng/ml de IFN- $\gamma$  y diferentes diluciones del medio condicionado por miofibroblastos disminuye la expresión de la molécula *Ia* del CMH II en los macrófagos, en una manera dependiente de la dilución del medio condicionado (dilución/% de supresión: 1:2/60.7; 1:4/51.52; 1:8/42.42; 1:16/34.85).
4. El contacto entre los miofibroblastos y los macrófagos, estimula la polarización de las moléculas *Ia* (*capping*), la elongación de la membrana citoplasmática (*blebbing*) de los macrófagos, con el consiguiente desprendimiento de fragmentos citoplasmáticos *Ia*-CMH II positivos (*shedding*) en estas células.

## **IX. RECOMENDACIONES**

1. Deben realizarse experimentos para aislar la sustancia inhibidora de la expresión de *Ia* en cultivos de miofibroblastos, para posteriormente utilizarla como inhibidor de *Ia* en modelos de miocarditis murina.
2. Siendo un estudio pionero, es necesario desarrollar experimentos relacionados con otras patologías cardiovasculares donde los miofibroblastos tienen una participación importante, tales como: el infarto de miocardio, las enfermedades cardíacas valvulares y la miocardiopatía dilatada.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A., Lichtman A., Pillai S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. 6ta edición. España. Edit. Elsevier. Pp. 566.

Abercrombie M., Heaysman J., Pegrum S. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res*, 59:393-398.

Agocha A., Eghbali-Webb M. 1997. *A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172 (1-2): 195-198.

Análisis de la Situación de Salud en el Perú (ASIS). 2001. Ministerio de Salud del Perú. Lima, Perú.

Aoki V., Sousa J., Fukumori L., Périgo A., Freitas E., Oliveira Z. 2010. *Direct and indirect immunofluorescence*. *An. Bras. Dermatol.*, 85(4): 490-500.

Aretz H. 1987. *Myocarditis: The Dallas criteria*. *Hum Pathol*, 18:619-624.

Banerjee I., Fuseler J., Price R., Borg T., Baudino T. 2007. *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(3): 1883 - 1891.

Baum, J., Duffy, H. 2011. *Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about?* *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(4): 376–379.

Bradley L., Douglass M., Chatterjee D., Akira S., Baaten B. 2012. *Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling*. *PLoS Pathog*, 8:e1002641.

Brown R., Ambler S., Mitchell M., Long C. 2005. *The cardiac fibroblast: Therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:657–687.

Burchfield J., Xie M., Hill J. 2013. *Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2*. *Circulation*, 128: 388-400.

Caforio A., Pankuweit S., Arbustini E., Basso C., Gimeno-Blanes J., Felix S, Fu M, Heliö T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto Y, Ristic A, Schultheiss H, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott P. 2013. *Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J.*; 34:2636-2648.

Camelliti P., Green C., LeGrice I., Kohl P. 2004. *Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: Structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling*. Circ Res, 94:828–835.

Cramer L., Siebert M., Mitchison T. 1997. *Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force*. The Journal of Cell Biology, 136(6): 1287–1305.

Darby I, Skalli O, Gabbiani G. 1990.  *$\alpha$ -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing*. Lab Invest., 63:21–29.

Dec G., Palacios I., Fallon J, Aretz H, Mills J, Lee D, Johnson R. 1985. *Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies: Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome*. N Engl J Med, 312:885–890.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. The Journal of cell biology, 122:103–111.

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis N. 2010. *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 48:504–511.

Dostal D., Shannon G., Baudino T. 2015. *Cardiac Fibroblast Physiology and Pathology*. Compr Physiol, 5:887-909.

Duerrschmid C, Crawford J, Reineke E, Taffet G, Trial J, Entman M, Haudek S. 2013. *TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis*. J Mol Cell Cardiol, 57:59–67.

Elson E., Qian H., Fee J., Wakatsuki T. 2018. *A model for positive feedback control of the transformation of fibroblasts to myofibroblasts*. Progress in Bio Mol Bio, 1-11.

El Kasmi, K.; Pugliese, S.; Riddle, S.; Poth, J.; Anderson, A.; Frid, M.; Li, M.; Pullamsetti, S.; Savai, R.; Nagel, M.; Fini, M.; Graham, B.; Tudor, R.; Friedman, J.; Eltzsching, H.; Sokol, R.; Stenmark, K. 2014. *Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension*. The Journal of Immunology, 193: 597–609.

Entman M., Michael L., Rossen R., Dreyer W., Anderson D., Taylor A., Smith C. 1991. *Inflammation in the course of early myocardial ischemia*. Faseb J, 5:2529–2537.

Epelman S., Lavine K., Beaudin A., Sojka D, Carrero J, Calderon B, Brija T, Gautier E, Ivanov S, Satpathy A, Schilling J, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg

E, Yokoyama W, Unanue E, Colonna M, Randolph G, Mann D. 2014. *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation*. Immunity 40:91–104.

Erlich J., Apostolopoulos J., Wun T., Kretzmer K., Holdsworth S., Tipping P. 1996. *Renal expression of tissue factor pathway inhibitor and evidence for a role in crescentic glomerulonephritis in rabbits*. J Clin Invest, 98:325–335.

Evans S. 2015. *The Multifaceted Roles of Cardiac fibroblasts*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, JMCC9734.

Eyden B. 2008. *The myofibroblast: phenotypic characterization as prerequisite to understanding its functions in translational medicine*. J Cell Mol Med, 1: 22–37.

Farr A., Dorf M., Unanue E. 1977. *Secretion of mediators following T lymphocyte:macrophage interaction is regulated by the mayor histocompatibility complex*. Proc Nat Acad Sci USA, 74:3542-3546.

Fernández E., O'Toole P., Morrison I., Cherry R., Fernández N. 2003. *Interaction of HLA-DR with actin microfilaments*. Hum Immunol, 64:327-337.

Frangogiannis N. 2014. *The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities*. J Cardiovasc Pharmacol, 63:185–195.

Frangogiannis N., Michael L., Entman M. 2000. *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovascular Res, 48:89–100.

Frantz, S.; Nahrendorf, M. 2014. *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. Cardiovascular Research, 102:240–248.

Frustaci A., Chimenti C. 2015. *Immunosuppressive therapy in myocarditis*. Circ J, 79:1- 7.

Gabbiani G, Hirschel B, Ryan G, Statkov P, Majno G. 1972. *Granulation tissue as a contractile organ: A study of structure and function*. The Journal of experimental medicine, 135:719–734.

Gabbiani G. 2003. *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. J Pathol, 200:500–503.

Gajewski Z., Faundez R., Thun R., Pawlinski B. 2006. *Adrenergic stimulation and blocking of hormonal secretion activity of cultured cow granulosa cells*. Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, 57 (Supplement 8):125–137.

Greenwood F., Hunter W., Glover J. 1963. *The preparation of (<sup>131</sup>I)-labeled human growth hormone of high specific activity.* Biochem J, 89:114-123.

Gidday J., Gasche Y., Copin J., Shah A., Perez R., Shapiro S., Chan P., Park T. 2005. *Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289:H558–H568.

Harary I., Farley B. 1963. *In vitro studies on single beating rat heart cells. I. Growth and Organization.* Experimental Cell Research, 29: 451–465.

Harris A., Dunn G. 1972. *Centripetal transport of attached particles on both surfaces of moving fibroblasts.* Exp Cell Res, 73:519-523.

Hinz B. 2009. *Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis.* Curr Rheumatol Rep, 11(2):120-126.

Honda M., Yoshimura T., Miura K., Hayashi H. 1985. *Mediation of macrophage reactions in immune tissue injury.* Act Pathol Jap, 35:269-280.

Hüttner I., Costabella P., De Chastonay C., Gabbiani G. 1982. *Volume, surface, and junctions of rat aortic endothelium during experimental hypertension: a morphometric and freeze fracture study.* Laboratory Investigation, 46(5):489-504.

Ivey M., Tallquist M. 2016. *Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope.* Circ J., 80(11): 2269–2276.

Johnson W., Kelley A., Connor J., Dalton B., Meunier P. 1989. *Inhibition of IFN-gamma-induced Ia antigen expression on synovial fibroblasts by IL-1.* J Immunol, 143:1614-1618.

Kakkar R., Lee R. 2010. *Intramyocardial fibroblast myocyte communication.* Circ Res, 106:47– 57.

Kawai S., Shimada T. 2014. *Inflammation in takotsubo cardiomyopathy? Inquiry from “Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009)”.* J Cardiol, 63:247–249.

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. 2008. *Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis.* Circulation 118:639–648.

Krenning G., Zeisberg E., Kalluri R. 2010. *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis.* Journal of cellular physiology, 225:631–637.



Kupfer A., Singer S. 1989. *Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples*. Ann Rev Immunol, 7:309-337.

Kurt-Jones E., Beller D., Mizel S., Unanue E. 1985. *Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA, 82: 1204-1208.

Lam P., Huttenlocher A. 2013. *Interstitial leukocyte migration in vivo*. Current Opinion in Cell Biology, 25(5): 650–658.

Lämmermann T., Germain R. 2014. *The multiple faces of leukocyte interstitial migration*. Seminars in Immunopathology, 36(2): 227–251.

Lindner D., Zietsch C., Tank J., Sossalla S., Fluschnik N., Hinrichs S., Maier L., Poller W., Blankenberg S., Schultheiss H., Tschope C., Westermann D. 2014. *Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure*. Basic Res Cardiol, 109:428.

McMaster R., Williams A. 1979. *Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen*. Eur J Immunol, 9:426-433.

Miyagawa M., Yokoyama R., Nishiyama Y., Ogimoto A., Higaki J., Mochizuki T. 2014. *Positron emission tomography-computed tomography for imaging of inflammatory cardiovascular diseases*. Cir J, 78:1302–1310.

Mori M., Hayward A. 1984. *Persistence of Ia antigen and antigen-presenting activity by cultured human monocytes*. Clin Immunol Immunopathol, 30:387-392.

Moseley T., Haudenschild D., Rose L., Reddi A. 2003. *Interleukin-17 family and il-17 receptors*. Cytokine & growth factor reviews, 14:155–174.

Park H., Lee D., Oh S., Lim J, Hwang H, Park S, Pak H, Lee M, Joung B. 2014. *Increased phosphorylation of Ca<sup>2+</sup> handling proteins as a proarrhythmic mechanism in myocarditis*. Cir J, 78:2292–2301.

Peña C., Vargas R., Hernández-Fonseca J., Mosquera J. 2018. *Cardiac myofibroblast induces decreased expression of major histocompatibility complex class II (Ia) on rat monocyte/macrophages*. Tissue and Cell, 54:72-79.

Pinto A., Ilinykh A., Ivey M., Kuwabara J., D'Antoni M., Debuque R., Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal N, Tallquist M. 2016. *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 118(3):400-409.

Pinto L., Frade A., Baron M., Navarro I., Kalil J., Chevillard C. 2014. *Interferon-γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy*. World J Cardiol, 6:782–790.

Porter K., Turner N. 2009. *Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 123:255–278.

Reis e Sousa C., Unanue E. 2014. Antigen processing. Curr Op Immunol, 26:138-139.

Rohr S. 2009. *Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias?* Heart Rhythm, 6:848–856.

Sabri A., Short J., Guo J., Steinberg S. 2002. *Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: Distinct par-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes*. Circ Res, 91:532–539.

Santiago J., Dangerfield A., Rattan S., Bathe K, Cunnington R, Raizman J, Bedosky K, Freed D, Kardami E, Dixon I. 2010. *Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: Expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts*. Develop Dynam, 239:1573–1584.

Saparov A., Ogay V., Nurgozhin T., Chen W., Mansurov N., Issabekova A., Zhakupova J. 2017. *Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction*. Inflammation Research, 66(9): 739-751

Schreiner G., Kiely L., Cotran R., Unanue E. 1981. *Characterization of resident glomerular cells in the rat expressing Ia determinants and manifesting genetically restricted interactions with lymphocytes*. J Clin Invest, 68:c920-c933.

Shinde A., Frangogiannis N. 2014. *Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair*. J Mol Cell Cardiol, 70C:74–82.

Singer S. 1982. *Structure of the cell surface*. Natl Cancer Inst Monogr, 60:25-30.

Siquier B., Sanchez-Alvarez J., Garcia-Mendez E., Sabria M., Santos J., Pallares R., Twynholm M., Dal-Re R. 2006. *Efficacy and safety of twice-daily pharmacokinetically enhanced amoxicillin/ clavulanate (2000/125 mg) in the treatment of adults with community-acquired pneumonia in a country with a high prevalence of penicillin-resistant streptococcus pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 57:536–545.

Snyder D., Beller D., Unanue E. 1982. *Prostaglandins modulate macrophage Ia expression*. Nature, 299:163-165.

Souders C., Bowers S., Baudino T. 2009. *Cardiac fibroblast: The renaissance cell*. Circ Res, 105:1164–1176.

Tashjian A., Voelkel E., McDonough J., Levine L. (1975). *Hydrocortisone inhibits prostaglandin production by mouse fibrosarcoma cells*. Nature, 258:739-741.

Tilley R., Pedersen B., Pawlinski R., Sato Y., Erlich J., Shen Y., Day S., Huang Y., Eitzman D., Boisvert W., Curtiss L., Fay W., Mackman N. 2006. *Atherosclerosis in mice is not affected by a reduction in tissue factor expression*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 26:555–562.

Turner N. 2011. *The cardiac fibroblast*. 1st ed. Kerala: Research Signpost.

Turner N., Das A., Warburton P., O'Regan D., Ball S., Porter K. 2009. *Interleukin-1 alpha stimulates pro-inflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts*. Am J Physiol Heart Cir Physiol, 297: H1117– H1127.

Van Linthout, S.; Miteva, K.; Tschope C. 2014. *Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells*. Cardiovascular Research, 102, 258–269.

Vespa L., Johnson S., Aldrich W., Zwilling B. 1987. *Modulation of macrophage IA expression: lack of effect of prostaglandins and glucocorticoids on macrophages that continuously express IA*. J Leuk Biol, 41:47-54.

Wang W., Chadee K. 1995. *Entamoeba histolytica suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex I-A molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism*. Infect Immun, 63:1089-1094.

Weber K., Sun Y., Bhattacharya S., Ahokas R., Gerling I. 2013. *Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart*. Nat Rev Cardiol, 9: 119-136.

Weinberger T., Schulz C. 2015. *Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling*. Front Physiol, 6:107.

Wiehelman K., Braun R., Fitzpatrick J. 1988. *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay. Identification of the groups responsible for color formation*. Ann Biochem, 175:231–237.

Williams A., Galfre G., Milstein C. 1977. *Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes*. Cell, 12:663-673.

Wojnicz R., Nowalany-Kozielska E., Wojciechowska C., Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek M, Wodniecki J. 2001. *Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: Two-year follow-up results*. Circulation, 104:39-45.

## **XI. ANEXOS**

## Anexo 1

### SOLUCIONES

#### Buffer fosfato salino (PBS) 0,001 M pH 7,4

Para preparar un litro de PBS, pesar:

NaCl.....	8,1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O.....	2,6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 H <sub>2</sub> O.....	0,3 g

Diluir las sales en 900 mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 7,4 utilizando NaOH 1 M.

En una probeta, enrasar a un litro con el agua destilada.

Conservar en refrigeración (4 °C).

#### Solución enzimática (pH 7,2)

Para preparar un litro de solución, pesar:

NaCl.....	8 g
KCl.....	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	1,5 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,4 g
Dextrosa.....	0,8 g
Colagenasa tipo II.....	0,8 g

Diluir en 900 mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 7,2.

En una probeta, enrasar a un litro con el agua destilada.

Conservar en refrigeración (4°C).

**Solución de dispersión (pH 7,1)**

Pesar 6 g de HEPES.

Diluir en 900ml de solución salina balanceada de Hank

Ajustar el pH a 7,1.

En una probeta, enrasar a un litro con HEPES.

Conservar en refrigeración (4 °C).

Se obtendrá una concentración final de HEPES 25 µM.

**Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado**

Medio RPMI 1640.....	500 ml
Glutamina recién preparada.....	290 µg/ml
Penicilina.....	50 U/ml
Estreptomicina.....	50 µg/ml
HEPES.....	0,01 M
Suero fetal de ternera(10438018 Gibco, Grand Island, NY, EE. UU) inactivado por calor.....	10%

**Solución de azul tripano**

Mezclar 4 partes de la solución A (40 ul) con 1 parte de la solución B (10 ul).

## Anexo 2

### **TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETECTAR LA MOLÉCULA *Ia* EXPRESADA EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS**

(Aoki *et al.*, 2010)

1. Sobre la muestra se añade el anticuerpo monoclonal anti-*Ia* de rata en la dilución apropiada y en cantidad suficiente para cubrirla por completo (aproximadamente 10 ml de esta solución). Las láminas se mantienen a 37°C durante una hora en cámara húmeda.
2. Se colocan las láminas en las jarras koplín. Se añade PBS que se elimina al instante. Se agrega nuevamente PBS y se realiza un lavado de 5 minutos, se elimina el PBS y de esta misma forma se realizan otros dos lavados.
3. Se extraen las láminas de las jarras koplín, se dejan secar a temperatura ambiente y entonces, se añade el conjugado comercial (isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de rodamina o estreptavidina-ficoeritrina) que ha sido previamente titulado para determinar la dilución de trabajo. Esta dilución se prepara utilizando PBS + Azul de Evans, que servirá de contraste.
4. Las muestras se mantienen en contacto con el conjugado durante 30 min a 37°C en cámara húmeda.
5. Después de 3 lavadas, las láminas se secan a temperatura ambiente.
6. Se añaden 2 gotas por lámina de glicerina buferada (9 volúmenes de glicerina + 1 volumen de Tris 100 mM). Sobre la glicerina se coloca cuidadosamente el cubreobjetos con un ángulo de 45° con respecto a la superficie de las láminas de forma tal que no se forme burbujas que dificulten considerablemente la observación al microscopio.
7. Se observan las láminas al microscopio de epifluorescencia y se determina si las muestras son positivas o negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles que deben incluirse en cada experiencia.